

**Application de la Mesure Photométrique
de l'Acide Désoxyribonucléique
(A. D. N.)
au Dépistage Cytologique des Cancers
Gynécologiques**

Travail de la Clinique Gynécologique et de l'Institut Pasteur
de Lyon

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 JUIN 1960

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

CONTI CLAUDE

Externe des Hôpitaux de Lyon

Attaché de recherche à l'Institut National d'Hygiène

Né le 22 Juillet 1929 à GUELMA (Constantine)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1960

APPLICATION DE LA MESURE PHOTOMÉTRIQUE
DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE
(A.D.N.)
AU DÉPISTAGE CYTOLOGIQUE DES
CANCERS GYNÉCOLOGIQUES

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen Honoraire	MM. J. LÉPINE
Doyen	H. HERMANN
Assesseur	M. LEVRAT

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. NICOLAS, COLLET, GUIART, CADE, PATEL, LÉPINE, TRILLAT,
MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATÉ, MARTIN, GABRIELLE, SANTY

PROFESSEURS

Clinique médicale A.....	MM. LEVRAT
Clinique médicale B.....	P. RAVAUULT
Clinique et Prophylaxie cardio-vasculaires.....	FROMENT
Clinique chirurgicale A.....	MALLET-GUY
Clinique chirurgicale B.....	WERTHEIMER
Clinique chirurgicale C.....	BERTRAND
Clinique urologique.....	CIBERT
Clinique neuro-psychiatrique et Hygiène mentale.....	DECHAUME
Clinique des maladies infectieuses et bactériologie.....	X...
Clinique de chirurgie orthopédique et chirurgie infantile.....	GUILLEMINET
Clinique gynécologique.....	POLLOSSON
Clinique obstétricale.....	PIGAUD
Clinique stomatologique.....	DUCLOS
Clinique médicale infantile et Hygiène premier âge.....	BERNHEIM
Clinique ophtalmologique.....	PAUFIQUE
Clinique de pneumo-phtisiologie.....	BRUN
Clinique dermatologique et syphiligraphique.....	THIERS
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	MOUNIER-KUHN
Clinique médicale.....	CROIZAT
Physiologie.....	HERMANN
Anatomie pathologique.....	GUICHARD
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....	PONTHUS
	(détaché à Beyrouth)
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire.....	ROCHET
Chimie organique et Toxicologie.....	CHAMBON
Hydrologie thérapeutique, Climatologie et Ecologie sociale.....	DELORE
Chimie biologique et médicale.....	ENSELME
Histologie.....	KEHL
Pharmacie galénique et matière médicale.....	REVOL
Médecine du Travail.....	BOURRET
Hygiène et Action sanitaire et sociale.....	SOHIER
Biologie médicale et pharmacodynamie.....	JOURDAN
Botanique et cryptogamie.....	NETIEN
Chimie analytique pharmaceutique.....	BADINAND
Pharmacie et Pharmacologie.....	DREYON
Médecine légale et déontologie.....	ROCHE
Parasitologie et Pathologie exotique.....	COUDERT
Traumatologie des membres.....	J. CREYSSSEL
Cancérologie.....	DARGENT
Pathologie générale et expérimentale.....	P. GIRARD
Anatomie.....	LATARJET
Thérapeutique.....	M. GIRARD
Pathologie chirurgicale.....	PEYCELON
Pathologie médicale.....	VACHON
Physio-pathologie des voies respiratoires.....	GALY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine.....	M. BERGER
---	-----------

PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

Obstétrique.....	MM. BANSSILLON
Parasitologie.....	ROMAN
Bactériologie.....	A. BERTOYE
Physiologie.....	J.-F. CIER
Physiologie.....	CHATONNET
Pharmacie galénique et matière médicale.....	DORCHE

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS

Chimie biologique et médicale.....	MM. R. CREYSSSEL
Anatomie	DUROUX
Pharmacie et Pharmacologie.....	A. CIER
Anatomie pathologique.....	FEROLDI
Chimie organique et Toxicologie.....	PERROT
Thérapeutique	BRETTE
Histologie	DUMONT
Hygiène	THIVOLET
Parasitologie	GARIN
Physique	MORET
Cryptogamie	ODDOUX

AGRÉGÉS EN EXERCICE

Chargés d'enseignement

Neuro-Chirurgie	MM. LECUIRE
Cardiologie	GONIN
Obstétrique	J. MATHIEU
Orthopédie	J. MARION
Propédeutique médicale	PONT
Pathologie médicale	VIGNON
Pathologie médicale	REVOL
Pathologie chirurgicale.....	JAUBERT de BEAUJEU
Médecine générale.....	TRAEGER
Pathologie chirurgicale.....	GUILLEMIN
Electro-radiologie	PAPILLON
Obstétrique	BURTHIAULT
Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS
Pathologie médicale	DEVIC
Médecine légale.....	COLIN
Neurologie	GUYOTAT
Obstétrique	DUMONT
Urologie	L. DURAND
Chirurgie générale.....	FRANCILLON
Médecine générale.....	GUINET
Pathologie chirurgicale.....	SAUTOT
Chirurgie générale.....	P. MARION
Chirurgie générale.....	MICHAUD
Maladies infectieuses.....	MONNET
Oto-rhino-laryngologie	GIGNOUX
Stomatologie	FREIDEL
Médecine générale.....	PLAUCHU
Médecine générale.....	DESPIERRES
Chirurgie générale.....	De MOURGUES
Chirurgie générale.....	SAUBIER
Dermatologie et Syphiligraphie.....	COLOMB
Médecine du Travail.....	TOLOT
Neurologie et Psychiatrie.....	SCHOTT
Ophthalmologie	BONAMOUR

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. POLLOSSON, Président ; DARGENT, BERGER, MATHIEU, Assesseurs

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

**Application de la Mesure Photométrique
de l'Acide Désoxyribonucléique
(A. D. N.)
au Dépistage Cytologique des Cancers
Gynécologiques**

Travail de la Clinique Gynécologique et de l'Institut Pasteur
de Lyon

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 30 JUIN 1960

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

par

CONTI CLAUDE

Externe des Hôpitaux de Lyon

Attaché de recherche à l'Institut National d'Hygiène

Né le 22 Juillet 1929 à GUELMA (Constantine)



IMPRIMERIE DES BEAUX-ARTS
CAMILLE ANNEQUIN, 19, RUE ROUX-SOIGNAT, LYON

1960

390/62



A MES PARENTS

A MA FEMME

A MES ENFANTS

1910
1911
1912

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A NOTRE MAITRE ET PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur POLLOSSON

Il nous a ouvert son service et le laboratoire de sa Clinique avec une grande bienveillance, et nous lui devons une grande partie de nos connaissances. Il nous a fait l'honneur de nous confier ce sujet de thèse.

Nous avons apprécié chez lui la façon dont il favorisait les contacts, aussi bien sur le plan humain que sur le plan médical.

Depuis plus de dix ans, il n'a cessé de s'intéresser au problème du dépistage du cancer, et nous aimerions que ce travail reflète un peu du bon sens et de la probité dont il donne l'exemple.

Qu'il soit assuré de notre respectueux et profond attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur DARGENT

Nous savons l'intérêt qu'il attache à la cytologie. Aucune question concernant le cancer ne lui est d'ailleurs étrangère, et il a su au Centre anti-cancéreux de Lyon encourager l'esprit de recherche et les échanges entre spécialistes.

Nous sommes heureux qu'il nous ait fait l'honneur de faire partie de notre jury et nous l'en remercions respectueusement.

Monsieur le Professeur BERGER

Nous avons eu la chance de bénéficier de son enseignement. Etant donné notre bagage scientifique, il nous semblait téméraire d'entreprendre une pareille étude. Aussi n'avons-nous pas hésité à lui demander conseil. Il nous a accueilli avec beaucoup d'attention chaque fois que nous l'avons sollicité et ses encouragements nous ont beaucoup aidé.

Nous le remercions de nous avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Agrégé MATHIEU

Nous connaissons la façon dont il s'est toujours intéressé au travail de laboratoire en liaison avec la clinique, et nous savons l'obligeance avec laquelle il nous apporte, chaque fois que nous nous permettons de les lui demander, sa grande expérience et une précieuse documentation, qu'il n'a jamais cessé d'augmenter.

Nous le remercions de nous avoir confié une partie des cas qui figurent dans notre thèse et sommes honorés de l'avoir pour juge.

A Monsieur le Professeur BUGNARD

Directeur de l'Institut National d'Hygiène

Sans la confiance qu'il nous a accordée en nous faisant bénéficier de l'aide de l'Institut National d'Hygiène, nous n'aurions pu réaliser ce travail. Nous le remercions très respectueusement.

A Monsieur le Professeur SÉDALLIAN (in memoriam)

A Monsieur le Professeur CROIZAT

Directeurs de l'Institut Pasteur de Lyon

C'est dans le laboratoire d'endocrinologie et avec du matériel technique de l'Institut Pasteur que ces recherches ont pu être exécutées dans le service du Professeur Pollosson. Nous sommes heureux de pouvoir leur exprimer ici nos remerciements de nous avoir placé dans les conditions les plus favorables à la poursuite de ce travail.

Au Docteur HAOUR
Chef de Laboratoire à la Faculté

Il nous a accueilli dans son laboratoire, où il s'est efforcé de nous faire partager sa grande connaissance de la cytologie.

Au cours de nombreuses années, nous avons eu le temps d'apprécier à leur valeur sa foi dans son art, sa probité scientifique, et l'étendue de sa culture.

Nous lui sommes très reconnaissant de tout ce qu'il a fait pour nous et l'en remercions très cordialement.

A NOS MAITRES DANS LES HOPITAUX

Externat :

Monsieur le Professeur BRUN

Monsieur le Professeur BONNET (in memoriam)

Monsieur le Docteur GAUCHERAND

Monsieur le Professeur POLLOSSON

Monsieur le Professeur PIGEAUD

Certificat d'études spéciales d'Obstétrique :

Monsieur le Professeur PIGEAUD

Nous avons eu le privilège d'apprendre l'Obstétrique et de préparer un certificat dans sa Clinique où l'organisation de l'enseignement peut servir de modèle.

Nous admirons sa curiosité scientifique toujours en éveil et la bienveillance avec laquelle il accorde, à tous ceux qui le sollicitent, l'appui de sa science et de son expérience obstétricale.

Nous sommes heureux de pouvoir lui dédier ce modeste travail et le remercions pour tout ce que nous lui devons.

A NOS CONFÉRENCIERS D'EXTERNAT

Messieurs les Docteurs MORNEX, DESBROSSES

A NOS CONFÉRENCIERS DE SPÉCIALITÉ

Messieurs les Docteurs GONNET, CHARVET, GABRIEL
NEUMANN, ROCHET

AUX MÉDECINS DE LA CLINIQUE OBSTÉTRICALE

AUX MÉDECINS DE LA CLINIQUE GYNÉCOLOGIQUE

Au Docteur MIKAELIAN

Tous les domaines de la gynécologie le passionnent, et tout particulièrement celui du dépistage du cancer qu'il a su amener à un rare degré d'efficacité grâce à son sens clinique, sa maîtrise de l'interprétation colposcopique, et ses efforts de coordination entre la clinique, la cytologie et l'histologie.

Sa collaboration de tous les jours a beaucoup apporté à ce travail ; nous le remercions respectueusement.

AUX CYTOTECHNICIENNES
DU LABORATOIRE DE LA CLINIQUE GYNÉCOLOGIQUE

Au début, elles nous ont initié aux techniques cytologiques. Notre travail a été grandement facilité par le soin méticuleux dont elles font preuve et l'enthousiasme avec lequel elles accueillent les travaux expérimentaux.

Nous les remercions vivement pour leur précieuse coopération.

A NOS AMIS ET CAMARADES
INTERNES, EXTERNES ET SPÉCIALISTES

INTRODUCTION

Le présent travail ne consiste pas en une recherche théorique. Il s'agit d'un essai d'application pratique de procédés techniques empruntés aux méthodes d'investigations complexes dont ont fait l'objet les acides nucléiques pendant ces dernières années.

Les laboratoires attachés aux services hospitaliers ont surtout comme rôle d'aider la clinique en élaborant des techniques suffisamment simples pour être utilisées comme procédés de routine, en essayant en même temps de donner des résultats aussi exacts que possible.

La collaboration entre biologistes et cliniciens tend à devenir de plus en plus étroite dans le domaine du cancer, surtout quand rentre en jeu le dépistage cytologique. Là plus qu'ailleurs apparaît la nécessité de confronter les résultats de la routine cytologique avec les données cliniques, seul moyen pour le clinicien d'apprécier véritablement l'efficacité de la cytologie et d'estimer à leur juste valeur les résultats qu'elle lui donne.

En effet, comme dans toute technique de laboratoire, et en particulier celles qui font appel à des données subjectives, la cytologie comporte un pourcentage d'erreurs et d'hésitations qui ne sont pas sans retentir sur l'opinion du clinicien vis-à-vis de la méthode. Sans parler de décisions thérapeutiques abusives qui ont pu être prises sur des réponses cytologiques erronées par des chirurgiens non informés, la cytologie, par ses divergences avec l'anatomie pathologique, introduit en clinique des problèmes nouveaux : celui par exemple du potentiel évolutif d'une lésion qui, jusque-là, s'est révélée bénigne par les moyens classiques d'investigation. D'où la nécessité d'utiliser des méthodes de plus en plus précises pour rechercher la lésion responsable de l'exfoliation des cellules présumées malignes : les biopsies répétées sous

contrôle colposcopique, les explorations chirurgicales plus larges, conisations, curetage explorateur, et enfin le travail considérable imposé à l'anatomo-pathologiste par la technique des coupes sériees.

Aussi nous a-t-il paru opportun de tenter d'améliorer la précision du diagnostic cytologique de routine en associant aux méthodes de coloration habituelles une technique cytochimique plus complexe, mais cependant accessible aux moyens dont dispose un laboratoire hospitalier.

C'est ainsi qu'au laboratoire de la Clinique Gynécologique, l'étude cytophotométrique de l'Acide Désoxyribonucléique nous a paru d'un intérêt tout particulier pour faire une étude plus approfondie de la structure nucléaire, base du diagnostic cytologique. Cet intérêt réside dans le fait que cette substance représente le constituant principal du noyau, que sa mise en évidence se fait par des techniques précises d'évaluation qualitatives et quantitatives, enfin qu'il semble bien exister une relation entre la nature du processus cancéreux et la teneur des noyaux en acides nucléiques, comme il ressort de certains travaux récents dont nous nous sommes inspirés.

Nous avons donc appliqué au matériel cytologique de routine la technique de mesure cytophotométrique de l'Acide Désoxyribonucléique des noyaux mis en évidence par une réaction spécifique : la réaction de Feulgen.

*
* *

Avant de faire état de nos résultats, il nous semble utile de résumer quelques notions concernant les Acides Nucléiques et les éléments techniques dont nous avons tiré parti.

PREMIÈRE PARTIE

L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE
ET SA MESURE HISTOPHOTOMÉTRIQUE

DONNÉES TECHNIQUES

LES ACIDES NUCLÉIQUES

PROCÉDÉS DE DÉTECTION ET DE MESURE

Depuis les travaux de Friedrich Miescher qui, en 1869, découvre la substance nucléaire qu'il appelle nucléine, et ceux de Richard Altmann qui, en 1899, introduit le terme d'acide nucléique les connaissances ont beaucoup évolué et ont donné lieu à une littérature extrêmement abondante dont il n'y a pas lieu de faire état ici.

Comme l'a montré Kossel, le successeur de Miescher, il existe deux acides nucléiques, l'**Acide Désoxyribonucléique (A.D.N.)** et l'**Acide Ribonucléique (A.R.N.)** qui, isolés l'un du sperme de poisson, l'autre des levures et du germe de blé, ont été longtemps attribués, le premier au règne animal, le second au règne végétal. En fait, ils se retrouvent également dans les deux règnes et diffèrent l'un de l'autre, d'une part par leur localisation dans les cellules, d'autre part par leur composition chimique ; certaines méthodes permettent d'ailleurs de les mettre en évidence séparément.

A. — LOCALISATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS LA CELLULE

Primitivement, on a cru l'A.D.N. localisé au noyau et l'A.R.N. au cytoplasme. En fait, des travaux cytologiques plus récents ont montré que si l'A.D.N. est localisé strictement au noyau, l'A.R.N. est principalement cytoplasmique mais se rencontre aussi dans certains éléments nucléaires.

Ces études localisatrices ont pu être poussées très loin grâce à la technique de coloration spécifique de Feulgen et celle d'absorption de la lumière ultra-violette de Caspersson. Caspersson a pu localiser l'A.D.N. aux disques sombres des chromosomes qui représentent la partie génétiquement active de ces organites. Quant à l'A.R.N., Caspersson a montré que le noyau en contient également. Tout d'abord au niveau du nucléole dont la structure est double : une partie centrale constituée d'A.R.N. et une partie périphérique constituée d'A.D.N. ; en outre, des travaux plus récents de Warren et Levis, confirmés par ceux de Dounce, tendent à prouver que tout l'A.R.N. du noyau n'est pas contenu dans les seuls nucléoles mais que les chromosomes en contiennent aussi. Ces faits sont en accord avec les phénomènes observés au cours de la mitose : le nucléole qui avait disparu est reconstitué à partir de certains éléments chromosomiques au cours de la télophase.

B. — CONSTITUTION CHIMIQUE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Les deux acides nucléiques ont des formules très voisines : ils sont tous deux constitués par des chaînes de polymérisation de poids moléculaire très élevé (plusieurs millions) dont l'élément monomère est un tétranucléotide. Ces tétranucléotides ont des structures analogues dans les deux acides, mais diffèrent par deux

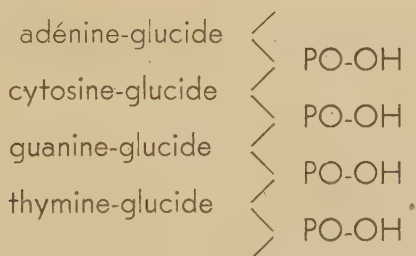
de leurs constituants : le **constituant glucidique** et une **base pyrimidique**.

L'hydrolyse des acides nucléiques donne, en effet, les éléments suivants :

A.D.N.	A.R.N.
Acide phosphorique désoxyribose	Acide phosphorique d-ribose
Bases puriques :	Bases puriques :
— adénine,	— adénine,
— guanine.	— guanine.
Bases pyrimidiques :	Bases pyrimidiques :
— cytosine,	— cytosine,
— thymine.	— uracile.

On voit que les constituants glucidiques sont le désoxyribose pour l'A.D.N. et le d-ribose pour l'A.R.N. ; les bases pyrimidiques sont la thymine pour l'A.D.N. et l'uracile pour l'A.R.N.

On représente l'élément monomère de l'A.D.N. par la formule développée suivante :



Il est d'autre part intéressant pour le cytologiste de noter que les macromolécules d'A.D.N. sont très stables et qu'on n'a jamais observé leur passage dans les différents liquides fixateurs. Les traitements par les acides dilués à chaud (dans les conditions de la réaction de Feulgen) ne le font pas non plus entrer en solution (Brachet [1], Overend et Stacey [2]). Au delà de 60 °C., l'A.D.N. se dépolymérise partiellement, mais ceci n'entraîne aucune modification de la coloration de Feulgen, ni aucune perte d'acide phosphorique (Pollister et Leuchtenberger [3]).

C. — DÉTECTION DES ACIDES NUCLÉIQUES

Il existe de nombreux procédés chimiques, physiques ou physico-chimiques de détection des acides nucléiques. Chacun d'eux utilise les particularités des différents constituants du tétranucléotide. Parmi ces procédés, certains sont spécifiques, d'autres ne le sont pas ; certains détectent globalement les deux acides, d'autres permettent une coloration différentielle. Nous rappellerons les plus classiques de ces moyens de détection et de mesure en insistant plus particulièrement sur la réaction de Feulgen, qui est le procédé que nous utilisons.

1° Spectrophotométrie ultra-violette de Caspersson (4, 5).

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les bases puriques et pyrimidiques, libres ou combinées, d'absorber fortement la lumière ultra-violette dans la région de 2.600 Angström : les acides nucléiques en renferment le tiers de leur poids. Cette méthode, sur des préparations fixées, est spécifique ; elle permet une évaluation quantitative, mais ne permet pas de différencier les deux acides.

2° Réaction de Brachet au vert de méthyle-pyronine et à la ribonucléase (6).

Cette réaction est de loin la plus utilisée pour la détection de l'A.R.N. En traitant des préparations par le mélange de Unna-Pappenheim : vert de méthyle-pyronine, l'A.R.N. se colore en rose par la pyronine tandis que l'A.D.N. fixe le vert de méthyl. Cette réaction n'ayant pas une spécificité suffisante, des préparations de contrôle sont traitées par la ribonucléase, qui supprime la colorabilité de l'A.R.N. par la pyronine.

3° Réaction à la désoxyribonucléase (7).

L'A.D.N. peut aussi être théoriquement détecté par la réaction précédente en utilisant, pour le contrôle, la désoxyribonucléase. Mais cette réaction est très peu utilisée étant donnée l'existence de moyens plus spécifiques de colorer l'A.D.N. La désoxyribonucléase est d'ailleurs très difficile à se procurer et les résultats de son action inconstants.

4° Réaction de Turchini, Castel et Khau-Van Kien (8).

Après hydrolyse acide des acides nucléiques, le résidu hydrocarboné donne avec la **phényltrihydroxyfluorone**, ou la **méthyltrihydroxyfluorone**, des réactions colorées différentes qui sont respectivement : une coloration bleu-violet ou violette pour l'A.D.N., et rose ou jaune-rosé pour l'A.R.N.

5° Basophile.

Tous les colorants basiques peuvent être utilisés pour détecter les acides nucléiques ; on peut même obtenir une coloration différentielle de l'A.D.N. et de l'A.R.N. Mais du point de vue cytochimique, ces colorations ne sont ni spécifiques, ni utilisables quantitativement si l'on se réfère aux travaux de Lison (13).

Toutefois, Sandritter (9, 10) utilise pour la mesure histo-photométrique la gallocyanine, à la fois basique et acide, avec comme mordant l'alun de chrome. C'est un colorant progressif qui donne en quarante-huit heures une coloration nucléaire pure d'un beau bleu profond. Mais elle présente les inconvénients de n'être point absolument spécifique, de colorer simultanément les deux acides, ce qui oblige à utiliser la ribonucléase pour la mesure de l'A.D.N., enfin de nécessiter une coloration de quarante-huit heures. Mais elle a, à son avantage, la simplicité de sa réalisation pratique (9).

6° Réaction nucléale de Feulgen-Rossenbeck (1924).

Feulgen (11) a découvert une réaction colorée spécifique de l'A.D.N. dont le principe est le suivant : ce corps, après hydrolyse acide, donne avec le réactif de Schiff naissance à un complexe coloré insoluble.

L'hydrolyse acide à la température de 60 °C. sépare spécifiquement de l'A.D.N. l'adénine et la guanine, libérant deux molécules de glucide qui se transforment en une tautomère aldéhydique (Overend et Stacey) ; ce dernier donne avec le réactif de Schiff la réaction caractéristique des aldéhydes.

La coloration étant obtenue, l'excès de réactif est enlevé avec une solution sulfureuse pour éviter toute coloration parasite par la fuchsine qui se libère du réactif de Schiff au contact de l'eau.

C'est cette technique de coloration que nous avons utilisée dans ce travail, et à ce titre, elle mérite d'être précisée.

MISE EN ÉVIDENCE PAR LA RÉACTION DE FEULGEN ET MESURE PHOTOMÉTRIQUE DE L'A.D.N. DANS LES NOYAUX

Dans le travail que nous avons fait, les préparations ont été traitées par la **réaction de Feulgen**, puis soumises à une mesure photométrique au moyen de l'**histophotomètre de Lison**.

Nous pensons qu'il est nécessaire de formuler d'une façon précise un certain nombre de données techniques appartenant à la réaction de Feulgen et à la cytophotométrie, et dont la connaissance est indispensable au cytologiste s'il veut obtenir de ces méthodes des résultats valables.

A. — TECHNIQUE DE LA COLORATION DE FEULGEN

Les étalements qui ont été fixés dans un mélange d'alcool-éther sont immergés dans l'eau distillée pendant 10 minutes après passage intermédiaire dans l'alcool à 95°.

- 1° **Hydrolyse** : on traite les préparations par une solution chlorhydrique normale (82,5 cm³ d'HCl concentré, de densité 1,19 pour un litre)
 - d'abord 1 minute à froid,
 - puis 7 minutes à 60 °C.
- 2° **Lavage** : passage rapide dans la solution chlorhydrique froide, puis l'eau distillée.

- 3° **Coloration** : par le réactif de Schiff pendant 1 h. 30 (note 1).
4° **Rinçage** : dans 3 bains sulfureux pendant 10 minutes chacun (note 2).
5° **Rinçage** à l'eau courante, puis coloration des cytoplasmes au vert lumière très dilué, déshydratation aux alcools, toluène, et montage.

Il convient d'insister sur un certain nombre de détails techniques, qu'il est important de respecter pour effectuer cette réaction.

1° **La fixation** : il est pratique d'utiliser le même fixateur que celui qu'on a adopté pour la méthode de routine. Dans notre laboratoire où nous utilisons la coloration de Papanicolaou, le fixateur utilisé est un mélange à parties égales d'alcool et d'éther.

2° **L'hydrolyse** : la durée de l'hydrolyse dépend du fixateur utilisé. Avec le mélange alcool-éther, nous avons établi que la durée optima est de 7 minutes. Pour les autres fixateurs, Lison rapporte, dans son ouvrage « Histochimie et cytochimie animales » (13), les durées d'hydrolyse.

La température du bain acide est très importante et ne doit pas s'écarter de 60° pour obtenir une hydrolyse correcte.

3° **Coloration** : le facteur essentiel de la réussite de ce temps est de posséder une bonne fuchsine. Actuellement, il est possible de se procurer en France du chlorhydrate de pararosaniline "Gurr", qui donne de très bons résultats. Néanmoins, chaque nouvel échantillon est testé avant son utilisation.

4° **Rinçage** : ce temps est très important : il a pour objet d'éliminer par le lavage sulfureux toute trace de réactif de Schiff restant sur les préparations avant passage dans l'eau. En effet, au contact de l'eau, le réactif est hydrolysé, libère de la fuchsine, qui colore en rouge les éléments basophiles, et entraîne, de ce fait, une erreur considérable dans la mesure photométrique.

Note 1. — Technique de préparation du réactif de Schiff :

1° Broyer 3 grammes de chlorhydrate de pararosaniline (fuchsine) qu'on dissout dans 400 cm³ d'eau distillée. Agiter jusqu'à dissolution complète.

2° Ajouter alors 3 grammes de bisulfite de soude anhydre, laisser reposer une heure.

3° Ajouter 6 cm³ d'HCl concentré.

Mettre le bac au réfrigérateur : la décoloration de la fuchsine se fait en quarante-huit heures et la teinte définitive est jaune-rosé, « pelure d'oignon ».

Note 2. — Cette solution se prépare en ajoutant extemporanément à 200 cm³ d'eau distillée, 3 grammes de bisulfite de sodium anhydre, et 10 cm³ d'HCl normal.

On devra donc employer des solutions sulfureuses préparées extemporanément, réparties en plusieurs bacs, et la durée totale du rinçage doit avoisiner une demi-heure.

Si toutes ces conditions sont respectées, la réaction de Feulgen est spécifique de l'A.D.N.

A chaque coloration, on vérifie la correction des résultats en s'assurant d'une part que les lames hydrolysées donnent avec le réactif de Schiff une bonne coloration (par la mesure cytophotométrique d'éléments de référence), d'autre part qu'une lame témoin n'ayant pas subi l'hydrolyse ne se colore pas par les temps suivants du procédé.

Le produit obtenu par la réaction de Feulgen n'est pas la fuch-sine, mais un nouveau corps coloré insoluble, dont la couleur est plus bleutée et le spectre d'absorption différent (Feulgen, Stowell et Albers [14]).

C'est l'insolubilité de ce nouveau corps coloré dans les bains de rinçage et le suc nucléaire qui donne à la réaction sa valeur localisatrice et permet le dosage photométrique de l'A.D.N. (Lison, Callan, Caspersson, Stowell, Brachet).

B. — PRINCIPES DE LA MESURE PHOTOMÉTRIQUE IN SITU

La mesure photométrique consiste à mesurer l'absorption par un objet du flux lumineux qui le traverse.

Si I_0 est l'intensité de la lumière avant passage à travers l'objet, et I son intensité après interposition de l'objet, le rapport $\frac{I}{I_0}$ est appelé **transmission T**.

L'**extinction d** se définit par l'équation :

$$d = -\log T.$$

Si l'on appelle **L** l'épaisseur de l'objet en centimètres, **c** la concentration de la substance dans l'objet en molécules grammes par litre, la loi de Beer s'exprime par l'équation :

$$d = \epsilon \cdot c \cdot L.$$

ou ϵ est le coefficient moléculaire d'absorption, constant pour une substance et une longueur d'onde données.

Pour un objet à faces parallèles ou une sphère, la quantité totale de substance q qu'il contient est

$$q = c.v$$

où v est le volume de l'objet.

$$\text{Comme } c = \frac{d}{\varepsilon.L}, \quad q = \frac{v.d}{\varepsilon.L} = \frac{s.d}{\varepsilon}, \text{ si l'on appelle } s \text{ la surface de}$$

l'objet mesurée perpendiculairement à l'axe optique.

Pour des noyaux de section circulaire, $s = \pi R^2$. Donc

$$q = \frac{\pi}{\varepsilon} d. R^2 \text{ molécules-grammes.}$$

Pour des mesures relatives, on peut utiliser la formule simplifiée

$$q = d R^2 \text{ unités arbitraires.}$$

En pratique, la mesure cytophotométrique consiste donc à déterminer

- 1° le diamètre de l'objet, c'est-à-dire du noyau à évaluer ;
- 2° l'extinction produite par l'interposition du noyau dans le flux lumineux.

Ceci nous conduit à envisager successivement l'appareillage optique utilisé et le montage électronique de mesure d'extinction.

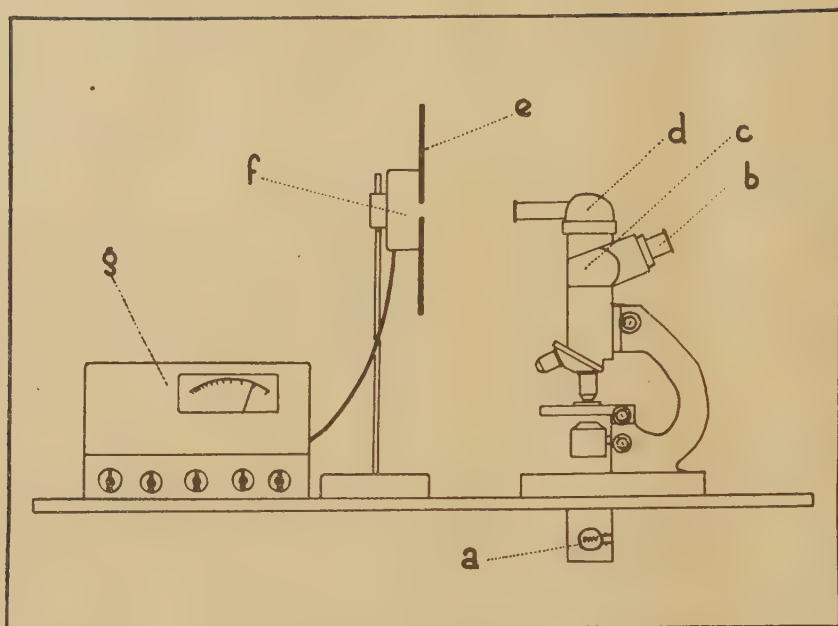
1° L'appareillage optique.

Différents perfectionnements apportés au cours de nos travaux nous ont conduits à un montage qui répond à la nécessité pratique d'effectuer aisément le repérage des noyaux et la mesure de ses dimensions. C'est, en effet, grâce à la relative rapidité des mesures actuelles que nous pouvons maintenant utiliser cette méthode d'une façon habituelle pour le contrôle des cas douteux.

Nous employons un microscope à fût vertical équipé d'une tête binoculaire de visée latérale semblable à celles des appareils destinés à la microphotographie. Cette tête est munie d'un micromètre oculaire (b) qui permet la mesure des dimensions nucléaires. Le microscope comporte un objectif de faible grossissement pour le repérage ($\times 60$), et un objectif à immersion pour la mesure photométrique. Son axe optique est surmonté d'un prisme à réflexion totale (d) qui projette l'image de la préparation sur l'écran de l'histophotomètre (e).

Un miroir basculant (c) permet le renvoi de l'image soit sur la tête binoculaire et le micromètre, soit sur le prisme et l'écran.

La source lumineuse doit être très intense pour permettre de travailler à de forts grossissements avec image projetée. Elle consiste en une lampe à bas voltage et filament ramassé (a), alimentée par une batterie d'accumulateurs qui assure une constance d'ampérage que le courant industriel, même stabilisé, ne saurait fournir.



2° L'appareil électronique de mesure d'extinction.

Nous utilisons l'appareil de Lison (13). Cet appareil comporte deux éléments séparés : une cellule photoélectrique et un boîtier contenant les instruments de mesure.

La cellule photoélectrique (f) est placée derrière un écran blanc vertical, percé en son centre d'un diaphragme fixe. Ecran et cellule sont solidaires et montés sur un bâti mobile, ce qui permet de placer le diaphragme au centre du champ projeté et l'écran dans un plan perpendiculaire aux rayons incidents. Un coulisseau obturateur, interposé entre le boîtier étanche de la cellule et l'orifice de l'écran, permet de mesurer, pour tarer l'appareil, le courant d'obscurité de la cellule photoélectrique.

Le boîtier-pupitre (g), placé à côté de l'opérateur, contient les organes électriques de l'histophotomètre ainsi que le cadran de lecture.

Le courant de la cellule est amplifié par un multiplicateur d'électrons alimenté par le secteur au moyen d'un circuit comportant une régulation électronique automatique. Un autre amplificateur, à sensibilité variable, est incorporé à l'instrument.

Le cadran comporte deux échelles : l'une linéaire qui indique la valeur de la transmission, l'autre logarithmique qui permet de lire directement la valeur de l'extinction.

L'utilisation du photomètre dépend essentiellement du type de son montage électronique. Théoriquement, le réglage comporte le tarage de l'appareil, la compensation du courant d'obscurité de la cellule, puis le réglage du zéro de l'aiguille sur un « blanc de la préparation » (détermination de I_0). Ces opérations terminées, on amène l'image des noyaux à tester en regard du diaphragme de l'écran : on lit alors directement sur le cadran la valeur de l'extinction d .

3° Validité des mesures photométriques.

Une étude critique détaillée de la valeur des mesures photométriques a été effectuée par Lison (13). Nous en avons extrait un certain nombre de conditions de validité qui concernent l'histophotométrie.

a) Identité de l'image et de l'objet.

Pour que des mesures photométriques sous le microscope soient exactes, il faut que la distribution de l'intensité lumineuse dans l'image donnée par le microscope corresponde à la distribution dans l'objet. Caspersson (4) a montré que cette condition est remplie pour des systèmes de lentilles ayant une ouverture numérique supérieure à 1,00 et pour des objets microscopiques dont la dimension est supérieure à trois ou quatre fois la longueur d'onde utilisée.

b) Absorption non spécifique.

Des erreurs sont causées par des pertes non spécifiques de lumière dues à des phénomènes de réflexion et de réfraction au niveau de parties d'indices différents. Caspersson (4) a pu calculer cette erreur pour une sphère.

On constate que l'erreur est nulle ou négligeable pour toutes les mesures effectuées à moins d'un demi-rayon du centre de la sphère, dans le cas extrême d'indices atteignant 1,1 par rapport au milieu ambiant.

En pratique, cette erreur est négligeable en lumière blanche si les mesures sont effectuées dans la partie centrale des objets. Ces notions doivent guider le choix du diaphragme dont le diamètre doit être inférieur au tiers du diamètre des noyaux à mesurer.

c) Erreur instrumentale de mesure.

L'erreur dans la détermination des valeurs de I et de I_0 est fonction des caractéristiques de l'appareil. Par ailleurs, l'erreur dans la détermination de la transmission ne se répercute pas linéairement sur l'erreur de l'extinction puisque ces deux éléments sont liés par une fonction exponentielle. Lison (15) a montré que pour une erreur absolue de 0,5 % sur T , l'erreur effective sur d est faible (2 à 3 %) entre des transmissions de l'ordre de 10 à 70 %. En deçà et au delà de ces valeurs, l'erreur sur d croît rapidement et devient inacceptable.

d) Détermination du blanc.

Le blanc devrait être tel que la perte d'intensité lumineuse due à des causes non spécifiques y soit exactement la même que dans l'objet à mesurer. Lison recommande de prendre comme blanc le cytoplasme de la cellule en un point voisin du noyau à étudier. En pratique, dans les cellules cancéreuses, ce cytoplasme est réduit à une mince collerette qui ne se prête pas à la mesure ; aussi choisissons-nous comme blanc une partie de la préparation apparaissant optiquement vide. Ceci suppose que les cytoplasmes ont été colorés aussi légèrement que possible et que leur extinction est négligeable par rapport à celle des noyaux.

e) Hétérogénéité optique du matériel.

Ce fait est pour Lison à la source de deux sortes d'erreurs :

Des erreurs aléatoires résultant du fait que les mesures sont différentes suivant le point examiné. On y pallie en faisant un certain nombre de mesures dont on prendra une moyenne.

Des erreurs systématiques résultant du fait que la loi reliant la transmission à la densité optique est logarithmique. Les valeurs calculées sont trop basses et le sont d'autant plus que le matériel est moins homogène.

Néanmoins, le calcul et la vérification expérimentale montrent que l'erreur, assez grande quand on tente des mesures en valeur absolue, peut être négligée pour des mesures relatives.

C. — VALIDITÉ DES MESURES QUANTITATIVES DE L'A.D.N. PAR LA MÉTHODE CYTOPHOTOMÉTRIQUE

La réaction de Feulgen peut servir à la mesure quantitative de l'A.D.N. et a déjà été utilisée par de très nombreux auteurs (Pollister, Ris, Pasteels, Lison, Swift, Schrader, Leuchtenberger, Vendrely, Alfert, etc...).

Si l'étude théorique de la dispersion et la déviation par rapport à la loi de Beer sont très difficiles à étudier dans les conditions d'emploi de la cytophotométrie, il existe néanmoins des preuves indirectes de la valeur de cette méthode qui ont été rapportées par Lison et Pasteels :

1° Pendant la spermiogénèse, alors que la quantité d'A.D.N. du noyau reste constante, le volume nucléaire décroît de 15 à 1 chez le rat. Malgré cette variation considérable de concentration, la mesure histophotométrique de l'A.D.N. donne des chiffres constants.

2° Dans l'œuf fécondé de *Sabellaria*, les teneurs trouvées en A.D.N. sont identiques dans les volumineux pronucléi et dans la plaque équatoriale de la première mitose équationnelle.

3° Les mesures effectuées sur des érythrocytes de pleurodèles donnent des résultats identiques pour des variations de concentration de 1 à 8.

4° Mirski et Ris (16) trouvent, pour la mesure de noyaux isolés, des chiffres identiques par dosage chimique et mesure histophotométrique.

En pratique, il est très difficile de réaliser par la méthode photométrique des mesures en valeur absolue, mais on peut effectuer des mesures relatives exprimées en unités arbitraires. Ris et Mirski (16) affirment que la réaction de Feulgen, effectuée dans des conditions standardisées, donne des résultats reproductibles. Lison, Pasteels et Swift ne sont pas de cet avis car une variable ne peut être contrôlée : le vieillissement du réactif de Schiff.

Personnellement, nous avons contrôlé des échantillons de même matériel, colorés par la même technique, mais avec des réactifs préparés séparément, ce qui représente nos conditions habituelles de travail : les variations obser-

vées entre les lames de deux bains différents s'inscrivent dans les variations qui existent, dans une même lame, entre des cellules de même type, mais de diamètre différent (Note 1). L'écart maximum trouvé par rapport à la moyenne est de 4 %, ce qui, comme nous le verrons ultérieurement, est négligeable par rapport aux variations pathologiques admises qui sont supérieures à 600 % (Note 2).

Etant donnés ces écarts constatés entre le normal et le pathologique, on peut admettre que dans nos conditions d'utilisation de la méthode cytophotométrique, les chiffres obtenus sont suffisamment significatifs alors même que les nécessités pratiques nous obligent à comparer entre elles des lames colorées dans des bains différents.

Note 1. — Quel que soit l'aspect de conservation du réactif de Schiff, nous ne l'utilisons jamais au delà d'un mois après sa préparation.

Note 2. — Sandritter a effectué le même contrôle et a trouvé un écart maximum de 8 % entre des bains différents.

DEUXIÈME PARTIE

APPLICATION DE LA MESURE CYTOPHOTOMÉTRIQUE DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE AU DÉPISTAGE CYTOLOGIQUE

TRAVAIL PERSONNEL

Il était utile de rappeler ces notions théoriques dont nous avons tenu compte pour mettre au point l'examen cytophotométrique de nos préparations ; mais cette étude a été entreprise, nous le redirons, surtout dans un but pratique : celui de solutionner le problème des erreurs et hésitations de la méthode de routine.

En effet, à côté des réponses erronées où la cytologie ne concorde pas avec l'anatomie pathologique (faux positifs et faux négatifs), il existe souvent des hésitations du diagnostic cytologique qui ne peut se prononcer ni pour la positivité, ni pour la négativité : ce sont les cytologies qui sont classées dans le groupe III et qui ne sont d'aucune aide pour le clinicien.

Si l'on consulte les nombreuses statistiques publiées, on constate toujours un certain nombre d'erreurs qui va jusqu'à 31 % suivant l'expérience du cytologiste et le type du cancer. Mais en fait peu d'auteurs font état de leurs hésitations qu'ils intègrent dans les cas dépistés. Pourtant, les débats qui ont lieu entre cytologistes, à l'occasion de réunions, montrent bien qu'il est impossible, pour certaines lames, d'établir un diagnostic.

Il n'existe, en effet, aucun caractère cytologique spécifique de la malignité (17, 18, 19, 20). Rappelons que le diagnostic de cancer est basé essentiellement sur la structure des noyaux en tenant compte de l'hyperchromatisme, de la taille nucléaire, des variations de structure chromatinienne, ainsi que de la structure des nucléoles. Dans quelques cas également, les modifications de structure cytoplasmique telles que les variations de forme, de coloration, la vacuolisation, peuvent aider au diagnostic.

Cependant, ces modifications morphologiques peuvent également exister, à un degré plus ou moins marqué, dans des circonstances autres que les néoplasmes. Les éléments qui retiennent l'attention par leurs altérations nucléaires, et qui peuvent de ce fait être l'objet d'un diagnostic erroné ou hésitant, sont appelés cellules dyskaryotiques par certains, et cellules dysplasiques par d'autres.

Ces cellules ont fait l'objet, parmi les cytologistes, d'un certain nombre de controverses et de mises au point d'où il ressort qu'aucune définition précise n'a pu être unanimement adoptée (21).

Étymologiquement, la dyskaryose désigne une déviation de la morphologie nucléaire, mais a donné lieu à des définitions variées (Note).

La dysplasie désigne une croissance perturbée par opposition à l'orthoplasie et l'anaplasie.

Auteurs	CANCERS		PAS DE CANCERS	
	Nombre de cas	Faux négatifs	Nombre de cas	Faux positifs
Ayre, 1948	304	5,9 %	3.402	3,2 %
Ayre, 1949	191	4,18 %	3.398	0,44 %
Bickers et coll.	28	0	1.292	0,16 %
Botsford et Tucker.	65	9,2 %	2.914	0,7 %
Burns et coll.	74	24,3 %	6.345	0,3 %
Cuyler et coll.	594	11,3 %	14.559	0,43 %
Do Amaral	114	31 %	1.867	1 %
Gardia	54	8 %	3.923	0,6 %
Gates et Warren	81	23 %	1.203	1,3 %
Graham	690	14 %	7.641	0,9 %
Gusberg et Graham	74	14 %	914	1,2 %
Hopman	178	11,2 %	3.402	0,58 %
Ikeda	16	6,2 %	984	0
Isbell et coll.	60	6,6 %	929	1,17 %
Jones et coll.	89	7,8 %	329	2,6 %
Kraushaar et coll.	115	11,3 %	2.476	0,1 %
Limburg	449	7,6 %	5.854	5,9 %
Mac Sweeney et Mac Kay... ..	54	5 %	573	2 %
Papanicolaou	11	9,1 %	763	0,4 %
Papanicolaou et Traut	194	6 %	2.820	0
Parrett et coll.	25	0	958	1,4 %
Peters	31	3,3 %	1.352	0,08 %
Reagan et Schmitt	79	3,8 %	839	0,35 %
Reicher et coll.	85	10,6 %	3.415	0,50 %
Sarkistan	42	0	3.378	0,5 %
Scheffey et coll.	63	30 %	437	1,6 %
Shung	24	4,2 %	515	1,3 %
Skapier	30	6,6 %	9.970	0,3 %
Strecht Ribetro	60	0	2.440	0,32 %
Ulfelder	372	12,9 %	3.258	0,24 %
De Watteville et coll.	105	4,8 %	1.855	—
Wied	115	1,7 %	2.785	0,45 %

D'après Bourg, Gompel, et Pundel (18).

Tableau donnant un aspect des différentes statistiques de dépistage cytologique.

De Brux (22) distingue deux variétés de dysplasies : les dysplasies régulières (maturation perturbée ou dysharmonie de maturation nucléo-cytoplasmique) et les dysplasies irrégulières (atypies nucléo-cytoplasmiques suffisamment marquées pour poser le problème de leur potentiel évolutif). Les premières sont bénignes, tandis que les secondes donnent souvent lieu à des diagnostics hésitants.

La classification de De Brux a le mérite d'éliminer du problème toutes les cellules dont le diagnostic ne soulève pas d'hésitations et qu'il appelle dysplasies régulières. Mais en ce qui concerne les dysplasies irrégulières ou les dyskaryoses vraies, aucune définition ne nous a paru satisfaisante et l'on doit se contenter de conserver celle, somme toute assez vague, avec laquelle Papanicolaou (17) a introduit le terme en cytologie : « Une cellule dyskaryotique est une cellule suffisamment anormale pour donner l'impression de la malignité, mais pas assez pour justifier un diagnostic positif. Ces cellules sont classées dans le groupe III. »

Ces faits mettent bien l'accent sur le caractère particulièrement subjectif de la méthode de routine et sur la nécessité de rechercher, en dehors des techniques habituelles, des critères d'évaluation de la cellule cancéreuse. C'est en ce sens que la technique histophotométrique nous a paru intéressante, puisqu'elle pouvait introduire dans le diagnostic un facteur d'appréciation quantitatif : la mesure de l'augmentation de l'A.D.N. nucléaire dans les cellules cancéreuses.

Ce procédé nous a été inspiré par les travaux de nombreux auteurs qui, pour des études théoriques, ont effectué des évaluations quantitatives de l'A.D.N. d'une part dans les tissus normaux au cours de variations physiologiques, d'autre part dans des tissus tumoraux. Dans la plupart des cas, il s'agit d'études effectuées sur des préparations histologiques ou des broyats d'organes mesurés soit par des procédés physico-chimiques, soit par des procédés chimiques, comme par exemple les travaux de C. et R. Leuchtenberger (23) sur les variations fonctionnelles des cellules glandulaires et le contenu en A.D.N. des cellules tumorales, ceux de R. et C. Vendrely (24) sur la biologie de l'A.D.N. et ceux de Harkin (33) sur les variations de l'A.D.N. au cours du cycle génital dans les cellules de l'endomètre.

Note. — De nombreuses tentatives ont été faites pour définir la cellule dyskaryotique et la différencier morphologiquement de la cellule néoplasique (21).

Pour Papanicolaou, « la cellule dyskaryotique est une cellule dont le noyau présente des anomalies généralement admises comme critères de malignité, mais dont aucune d'elles ne s'écarte de l'aspect normal de son type : basal, parabasal, intermédiaire ou superficiel ».

A ce critère subjectif, R. Graham oppose un critère objectif : « Une cellule dyskaryotique est une cellule contenant un noyau malin typique. Elle diffère d'une vraie cellule cancéreuse en ce qu'elle a un cytoplasme normal et un rapport nucléo-cytoplasmique normal. »

Pour Peter Stoll, « la cellule dyskaryotique est une cellule qui présente une différenciation cytoplasmique normale et un noyau morphologiquement normal, mais immature quand on le compare à l'aspect du reste de la cellule ».

La définition de Terzano se rapproche de celle de Papanicolaou : « La cellule dyskaryotique est une cellule à noyau volumineux, irrégulier et hyperchromatique évoquant la malignité tandis que le cytoplasme est normal en taille et en aspect. »

Pour Ayre, la cellule dyskaryotique échappe à toute définition et « seule l'expérience du cytologiste peut faire la différence entre une cellule dyskaryotique inflammatoire et une cellule dyskaryotique d'état précancéreux ou de cancer in situ ».

En ce qui concerne la cytologie, de nombreux auteurs ont étudié l'A.D.N. des cellules isolées. Ce sont, on le sait, les travaux précurseurs de Caspersson et de l'Ecole Suédoise (4, 5, 45) qui inaugurent la méthode, et ceux de Pollister (3, 35) et de Lison (13). Mellors (25), aux U.S.A., a repris cette méthode dans le domaine plus particulier de la cytologie appliquée à la clinique et dans le but d'établir un procédé automatique d'évaluation quantitative. Vokaer (26) et ses collaborateurs bruxellois étudient cytophotométriquement les noyaux colorés par la réaction de Feulgen dans le but d'améliorer le dépistage cytologique. Sandritter (9), en Allemagne, effectue dans le même but des mesures photométriques en utilisant la galloxyanine. Pundel (18) étudie les variations physiologiques de l'A.D.N. au cours du cycle menstruel dans les cellules vaginales. Linder (34) propose une technique de photométrie photographique pour aider au dépistage. Boschann (27) étudie la cytochimie des cellules dyskaryotiques par des méthodes chimiques et Wied (28) par la spectrophotométrie et la fluorescence. Herovici utilise la réaction de Brachet pour étudier l'A.R.N. des cellules.

Mais tous ces travaux sont surtout d'intérêt théorique et seule une publication récente de Sandritter fait état de résultats statistiques (10). L'auteur rapporte les résultats comparés de la mesure cytophotométrique et de la méthode de routine (Papanicolaou) dans 37 cas, et note une concordance entre les deux méthodes, sans toutefois donner les références anatomo-pathologiques.

En ce qui concerne nos recherches personnelles, si au début nous nous sommes attachés à l'étude photométrique de diagnostics cytologiques évidents pour établir les bases de notre méthode, les travaux de ces deux dernières années consistent en l'étude comparative des cas hésitants, erronés, ou seulement incertains, qui appartiennent pour plus de la moitié à la statistique de 398 cas que nous rapportons.

A. — MÉTHODE

L'étude histophotométrique de l'A.D.N. des noyaux avait déjà fait l'objet d'un travail expérimental et d'une thèse (29, 30) inspirée par le laboratoire de la Clinique Gynécologique. Ce travail portait sur la mesure de 50 cas et donnait des premiers résultats encourageants bien que l'on n'ait mesuré que la densité optique des noyaux sans tenir compte de leurs dimensions, c'est-à-dire que l'on n'a pas évalué véritablement la teneur nucléaire en A.D.N.

En 1957, nous avons repris ce travail en bénéficiant des résultats antérieurs et de l'expérience acquise et en avons modifié les principes pour aboutir à la méthode que nous avons exposée (31, 32, 39).

Nous avons en premier lieu perfectionné notre appareillage, pour réaliser l'installation décrite plus haut, qui permet la mesure simultanée de l'extinction et de la surface nucléaire.

Puis nous avons défini une référence reproductible susceptible d'être utilisée par d'autres cytologistes employant des appareils différents.

Nous avons ensuite mesuré les teneurs en A.D.N. de noyaux provenant des circonstances cliniques les plus diverses et avons déterminé, à partir des résultats de ces mesures, la teneur maxima en A.D.N. rencontrée dans les étalements provenant de cas histologiquement bénins. Nous avons postulé que les noyaux qui présentent des charges supérieures à cette limite sont des noyaux néoplasiques.

Il restait alors à vérifier cette hypothèse sur un grand nombre de cas en comparant les résultats de l'évaluation cytophotométrique avec ceux de l'anatomie pathologique. Cette confrontation a fait ressortir la possibilité pratique d'effectuer le diagnostic du cancer en fonction des critères cytophotométriques adoptés.

Mais nous nous sommes rapidement aperçus que pour le contrôle des erreurs et hésitations de la cytologie de routine, nous aurions intérêt à pouvoir contrôler cytophotométriquement les noyaux même qui ont été l'objet d'hésitations ou d'erreurs.

Aussi, avons-nous été amenés à mettre au point **un procédé de décoloration qui permette d'effectuer une réaction de Feulgen sur les lames même qui avaient été colorées et évaluées par la méthode de Papanicolaou.** Outre son intérêt diagnostique, ce procédé nous a permis de reprendre, pour la mesure, un certain nombre de cas anciens de notre collection et d'étudier ainsi l'évolution de cas de dysplasies irrégulières et de cancers traités.

I. - UNITÉ DE MESURE ET BASE DE RÉFÉRENCE REPRODUCTIBLE

Nous avons montré par le calcul que **la teneur en A.D.N. d'un noyau est une valeur proportionnelle au produit de l'extinction par le carré du rayon nucléaire :**

$$q = \frac{\pi}{\varepsilon} \cdot d \cdot R^2 \text{ molécules grammes.}$$

Pour effectuer des mesures relatives, il est inutile de déterminer la valeur de la constante ε et l'on peut se contenter d'exprimer les teneurs en unités arbitraires :

$$q = d \cdot R^2$$

où : q est exprimé en unités arbitraires,
 d en unités de l'histophotomètre de Lison,
 R en microns.

L'unité ainsi définie est celle que nous utilisons pour exprimer nos mesures relatives.

Mais cette unité est fonction à la fois de l'appareillage optique, de l'appareillage électronique et du diaphragme de l'écran. Aussi, avons-nous tenu à la définir par rapport à une base de référence reproductible par d'autres cytologistes utilisant des matériels différents :

La quantité étalon choisie est la teneur en A.D.N. du noyau de la cellule intermédiaire de l'épithélium buccal de l'homme.

Nous avons choisi cette cellule parce que sa morphologie se rapproche beaucoup de celle de la cellule intermédiaire de l'épithélium vaginal et qu'elle présente les avantages suivants :

— Il est facile de trouver un étalement buccal indemne de toute inflammation aiguë ou chronique. Chez l'homme, on n'a pas noté dans la cytologie buccale de modifications cycliques analogues à celles constatées chez la femme.

— La cellule intermédiaire est au repos mitotique et ne risque pas de se trouver en train d'augmenter son contenu chromatinien pour préparer sa division. Enfin, les noyaux sont clairs, homogènes, réguliers, isolés et facilement accessibles à une mesure cytophotométrique rigoureuse. C'est ce dernier avantage qui nous a fait préférer son choix à celui, plus légitime,

d'une cellule haploïde : le spermatozoïde humain dont les petites dimensions entraînent une forte erreur dans l'évaluation de la surface nucléaire.

Nous avons mesuré le contenu en A.D.N. de 500 noyaux de cellules intermédiaires d'épithélium buccal provenant de 8 hommes et avons trouvé pour le produit d. R^2 la valeur moyenne de $375 \pm \frac{15}{7}$ unités arbitraires. Ce produit chez un même individu a donné pour 150 noyaux mesurés la valeur moyenne de 371 (Note).

Nous avons admis que le chiffre de 375 u.a. représentait la teneur diploïde en A.D.N., que nous exprimons par le symbole 2N.

Ainsi l'utilisation des cellules intermédiaires de l'épithélium buccal comme référence de base nous a paru justifiée.

II. - CRITÈRES CYTOPHOTOMÉTRIQUES DE MALIGNITÉ

Nous avons mesuré les teneurs en A.D.N. des noyaux provenant de l'étalement de prélèvements correspondant à des circonstances cliniques connues :

Il s'agissait de desquamations cellulaires provenant de cols sains, de cervicites, de trichomonases, d'atypies cervicales, d'épithéliomas malpighiens ou cylindriques.

Ces mesures nous ont conduits à définir **trois zones** correspondant à des caractères cytologiques différents. La première, de teneurs comprises entre 2 et 4N, correspondait cliniquement aux cas d'infection et cytologiquement aux frottis inflammatoires et dysplasiques.

La deuxième, comprise entre 4 et 6N correspondait cliniquement aux atypies épithéliales, aux inflammations chroniques, et à certaines infestations à trichomonas ; cytologiquement, elle correspond aux lames avec dyskaryoses et dysplasies irrégulières.

Note. — La mesure de l'extinction de 150 spermatozoïdes humains effectuée à titre de contrôle a donné le chiffre moyen de $64 \pm \frac{3}{3}$. Si l'on se réfère aux dimensions des têtes de spermatozoïdes publiées dans la littérature (en particulier par Mann, Longo, Joel), on obtient pour le produit d. R^2 des valeurs comprises entre 180 et 210 u.a., soit approximativement la moitié de la valeur 2N admise.

La troisième, qui groupe les teneurs en A.D.N. supérieures à 6N correspond cliniquement et cytologiquement aux néoformations malignes.

Nous avons donc admis comme hypothèse de travail, que les noyaux dont les teneurs en A.D.N. sont supérieures à la valeur limite de 6N peuvent être considérés comme des noyaux néoplasiques. C'est d'après ce critère qu'ont été évalués tous les cas dont il est fait état dans ce travail.

Si sur deux axes de coordonnées perpendiculaires, on porte en abscisse les densités optiques et en ordonnée le carré du rayon nucléaire, la courbe $d \cdot R^2 = 6N$ est une courbe d'allure hyperbolique centrée sur l'origine. Les noyaux dont le point représentatif est situé au-dessus de cette courbe sont ceux que l'on considère comme néoplasiques. Mais l'examen de cette courbe asymptotique montre que dès que l'on s'écarte des valeurs moyennes de d et de R , des variations minimales de l'un des facteurs entraînent des variations considérables du produit ; aussi n'avons-nous tenu compte, dans l'évaluation, que des noyaux dont le diamètre est compris entre 7 et 15 microns ; ceci revient, comme c'est l'usage quand on emploie une représentation mathématique, à n'utiliser que la partie moyenne de la courbe. Cette restriction excluait du même coup les faibles valeurs de densité optique pour lesquelles la mesure photométrique n'est pas significative.

La formule $q = d \cdot R^2$, établie pour des mesures in vitro, est très approximative quand il s'agit de mesures in situ et le fait que les dimensions nucléaires y figurent à la puissance 2 aggrave considérablement l'erreur sur le produit. Cette année, en nous appuyant sur les résultats de notre expérience et la connaissance que nous donnait la coloration de Papanicolaou de la nature de certains noyaux, nous avons remplacé la courbe limite $dR^2 = 6N$ par une courbe qui permet une utilisation plus large des mesures. Il s'agit d'une courbe semblable, légèrement translatée vers la droite et vers le bas (cf. schéma n° 2).

Cette nouvelle limite atténue la prépondérance des dimensions nucléaires au bénéfice de l'extinction et fait ainsi disparaître le risque de diagnostics faussement positifs dans la zone des grands diamètres nucléaires et celui de diagnostics faussement négatifs dans la zone des noyaux de forte extinction, mais de petit diamètre.

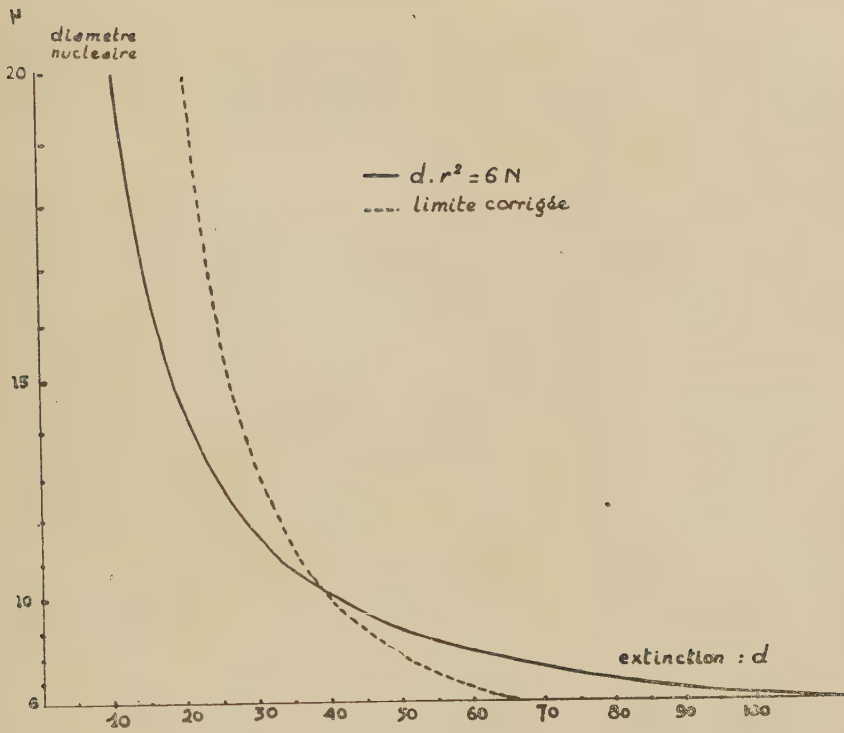


Fig. 2.

III. — PROCÉDÉ DE DÉCOLORATION DU MATÉRIEL DE LA CYTOLOGIE DE ROUTINE. VALEUR DE LA RECOLORATION PAR LA RÉACTION DE FEULGEN.

Tant qu'il s'est agi d'établir les bases de notre méthode, nous avons mesuré des prélèvements supplémentaires effectués par nous-même en même temps que ceux du diagnostic de routine.

Mais quand cette méthode nous a semblé en mesure de venir en aide à l'évaluation des cas hésitants de la technique de Papanicolaou, nous nous sommes trouvés dans **l'obligation de demander au clinicien de renouveler les prélèvements** en vue d'un contrôle cytophotométrique. Cette répétition de l'examen, pour les malades des consultations externes, n'était pas sans inconvénients; par ailleurs, nous ne retrouvions souvent pas sur le deuxième échantillon coloré en Feulgen, les mêmes types cellulaires que ceux qui avaient retenu l'attention en coloration de Papanicolaou.

Nous avons donc cherché **un procédé de décoloration qui permette d'effectuer une réaction de Feulgen sur les lames même dont les noyaux avaient paru suspects à l'évaluation de routine.**

Nous pouvons démontrer que les éléments repérés au Papanicolaou se retrouvent en coloration de Feulgen et qu'il est possible de faire une mesure photométrique de l'A.D.N. après décoloration des lames diagnostiquées au Papanicolaou sans que cette décoloration entraîne une modification quantitative de la coloration de Feulgen.

a) Technique.

Premier temps. - Les groupes de cellules qui ont retenu l'attention du cytologiste à la coloration de Papanicolaou sont repérés par les coordonnées de la platine du microscope; leurs caractères morphologiques sont notés et certains cas particulièrement intéressants sont microphotographiés.

Deuxième temps. - Décoloration de la lame.

La lamelle est décollée sur une platine tiède puis les lames sont immergées dans un bain de toluène pendant une heure: toute trace de Baume du Canada doit avoir disparu. La lame est ensuite plongée dans

— Alcool absolu: 1/2 heure.

— Eau courante: 1/4 d'heure.

Puis on lave la lame alternativement avec eau distillée et HCl concentré jusqu'à décoloration (qui se produit suivant l'épaisseur du prélèvement, en 10 à 15 secondes), et on la plonge dans l'eau courante pendant deux heures, ce qui parachève la décoloration.

Troisième temps. - Coloration des lames par la réaction de Feulgen.

Quatrième temps. - Etude cytophotométrique des noyaux repérés suivie de l'étude des autres noyaux de la lame.

Ce procédé a été adopté après une série d'expériences dans lesquelles nous avons étudié successivement chaque temps d'une manière systématique, jusqu'à obtention d'une méthode valable.

b) Etude critique.

1° Nous avons comparé entre elles des séries de 10 lames provenant de l'étalement d'un même prélèvement buccal, deux de ces lames étant colorées directement par le Feulgen, les huit autres d'abord par le Papanicolaou, puis décolorées et recolorées par le Feulgen dans le même bain que les lames témoins.

La mesure de 500 cellules intermédiaires de l'épithélium buccal a donné pour le produit d. R^2 , le chiffre moyen de 375, base de référence admise pour la valeur 2N:

Pour les frottis décolorés, cette moyenne a été pour 130 cellules :

Première série : 370 (— 9, + 1).

Deuxième série : 375 (— 9, + 18).

2° Nous avons procédé aux mêmes tests avec des étalements vaginaux, et nous avons obtenu les chiffres suivants :

— Frottis vaginaux colorés directement : 374 (— 11, + 10).

— Frottis vaginaux décolorés : 375 (— 12, + 11).

3° Pour 461 cellules décolorées provenant de 6 prélèvements répartis en 40 lames et recolorées dans 6 bains, la moyenne trouvée a été de 369,7.

Interprétation : la valeur du produit d. R^2 obtenue par la mesure des lames décolorées est donc comparable à celle admise pour base de référence. Elle est aussi comparable pour deux lames décolorées provenant non d'un même prélèvement.

On peut ainsi dire qu'il n'y a ni surcoloration provenant d'un résidu de fixation de l'hématoxyline, ni hypocolorabilité par la fuchsine de Schiff du fait d'une dénaturation de l'A.D.N. par la coloration antérieure.

En pratique, nous nous sommes aperçus que l'on peut contrôler la valeur d'une recoloration sur trois critères :

- coloration satisfaisante des pycnoses et des polynucléaires,
- non-coloration du fond nucléaire,
- non-coloration des nucléoles vrais.

4° Il restait à comparer les chiffres trouvés par la mesure de lames néoplasiques provenant d'un même prélèvement, l'une décolorée, l'autre colo-

rée directement. Dans les 40 lames néoplasiques étudiées à la fois par les deux procédés, la répartition des noyaux dans les différentes zones est parfaitement superposable dans les deux cas.

c) Avantages de la décoloration.

La décoloration permet le contrôle cytophotométrique des noyaux même qui ont provoqué une erreur ou une hésitation du diagnostic. La comparaison des microphotographies de ces éléments dans les deux colorations nous a permis d'avoir une connaissance plus approfondie des structures chromatiniennes et de mieux interpréter les cas hésitants. Mais surtout, nous pouvons, chaque fois qu'à l'évaluation de routine le diagnostic ne paraît pas évident, effectuer immédiatement un contrôle cytophotométrique sans avoir à demander au clinicien de nouveaux prélèvements.

En pratique, deux colorations de Feulgen sont prévues chaque semaine et le contrôle n'entraîne dans les réponses qu'un retard de 24 à 48 heures.

Chaque bain permettant de colorer 10 lames à la fois, tous les cas douteux peuvent être pratiquement contrôlés dans un laboratoire de débit moyen.

IV. - CONDUITE PRATIQUE DE LA MESURE PHOTOMÉTRIQUE

Comme pour l'évaluation de routine, nous effectuons dans un premier temps le repérage des noyaux à mesurer : ce sont d'une part les noyaux qui avaient paru litigieux à la coloration de Papanicolaou, d'autre part ceux qui, en coloration de Feulgen, apparaissent visuellement riches en A.D.N., soit qu'ils présentent une teinte rouge plus intense que l'ensemble des autres noyaux, soit que leurs dimensions soient supérieures à la normale. Quelquefois, en effet, la coloration de Feulgen fait apparaître des caractères chromatiniens que la coloration de Papanicolaou n'avait pas révélés. Les critères visuels d'appréciation de l'augmentation de la teneur des noyaux en A.D.N. étant très trompeurs, il convient

d'être très large dans ce repérage préalable et de noter tous les noyaux qui ne sont pas certainement normaux.

Les noyaux repérés sont ensuite mesurés à l'histophotomètre et l'on note leur extinction et leur diamètre. A partir de ces éléments, une table que l'on a préalablement réalisée, donne la valeur du produit d. R^2 .

Chaque fois qu'une lame contient plus de trois noyaux de teneur en A.D.N. supérieure à 6N, elle est considérée comme néoplasique ; quand elle contient seulement un à trois noyaux de teneur supérieure à 6N, elle est considérée comme douteuse.

Primitivement, nous exprimions nos résultats par le pourcentage des noyaux néoplasiques par rapport aux noyaux normaux. Mais ce mode d'expression nous a paru trop artificiel, car on peut faire varier dans des limites extrêmes le nombre des noyaux normaux mesurés. Actuellement, l'évaluation cytophotométrique des lames se fait donc comme dans la méthode cytologique de routine : le diagnostic de malignité est porté sur la présence de cellules à caractères néoplasiques parmi les éléments desquamés.

B. — RÉSULTATS

Nous rapportons maintenant les résultats de nos mesures. Une évaluation cytophotométrique de 424 cas a été effectuée. Ces cas se répartissent en deux groupes :

1° 398 cas sélectionnés parmi les prélèvements dont le diagnostic cytologique de routine **ne concordait pas toujours avec le diagnostic clinique ou anatomo-pathologique**, ou bien encore qui représentaient des cas de **diagnostic hésitant**.

Ces résultats ont d'abord été étudiés en comparant les réponses obtenues par la méthode de routine et celles obtenues par la cytophotométrie, puis en évaluant l'efficacité des deux méthodes par rapport aux deux types de cancers utérins (tumeurs du col et du corps).

2° 26 cas supplémentaires représentent des **cancers du col utérin traités par curiethérapie**. Ces cas ont été évalués par la cytophotométrie avant et après traitement pendant des périodes plus ou moins longues.

I. - CONTROLE CYTOPHOTOMÉTRIQUE DE 398 CAS DE CYTOLOGIES HÉSITANTES OU ERRONÉES

a) Résultats de la cytophotométrie en fonction de la cytologie de routine.

TABLEAU I

Cytologies négatives et faussement négatives : 221 cas.
Groupes II de Papanicolaou.

Ces 221 cas font partie du groupe II de Papanicolaou, mais ont été choisis parce que les lames contenaient des cellules dyskaryotiques ou que la réponse donnée était en désaccord avec l'anatomie pathologique : il s'agissait, en effet, de cancers cytologiquement non diagnostiqués, c'est-à-dire qu'on considère le cytodagnostic comme faux négatif.

Groupes II : 221 cas	Cytophotométrie		
	Positive	Négative	Douteuse
Pas de cancer.....	0	197	0
Cancer du col.....	5	5	0
Cancer du corps.....	3	8	3

Sur 221 groupes II représentant

- 197 réponses exactes et
- 24 erreurs,

la cytophotométrie a donné :

- 205 réponses exactes et
- 13 erreurs,
- 3 hésitations.

TABLEAU II

Cytologies positives et faussement positives : 113 cas.

Groupes IV et V de Papanicolaou.

Ces 113 cas sont des groupes IV et V de Papanicolaou, qui correspondent soit à des néoplasmes vérifiés, soit à des cytodiagnostics considérés comme faussement positifs, la biopsie n'ayant pas montré de cancer.

Groupes V : 113 cas	Cytophotométrie		
	Positive	Négative	Douteuse
Pas de cancer.....	8	11	1
Cancer du col.....	77	0	2
Cancer du corps.....	9	3	2

Sur 113 groupes IV et V de Papanicolaou représentant

- 93 réponses exactes et
- 20 erreurs,

la cytophotométrie a donné :

- 97 réponses exactes,
- 11 erreurs, et
- 5 hésitations.

TABLEAU III

Hésitations de la méthode de Papanicolaou : 64 cas.

Groupes III de Papanicolaou.

Ces 64 cas sont des groupes III de Papanicolaou (diagnostic hésitant) qui correspondent cliniquement soit à des lésions bénignes, soit à des lésions malignes .

Groupes III : 64 cas	Cytophotométrie		
	Positive	Négative	Douteuse
Pas de cancer.....	1	30	0
Cancer du col.....	25	1	0
Cancer du corps.....	4	2	1

Sur 64 cas d'hésitations de la méthode de Papanicolaou, le contrôle cytophotométrique a permis d'en **reclasser 59 dans le groupe concordant avec les résultats de l'anatomie pathologique :**

Il s'agit de :

- 30 cas sans cancer,
- 25 cas de cancer du col,
- 4 cas de cancer du corps.

Par ailleurs, on note 4 erreurs et une hésitation de la cytophotométrie.

b) Résultats comparés de la méthode de Papanicolaou et de la cytophotométrie dans le dépistage des cancers du col et du corps.

Les tableaux suivants représentent 115 cas de cancer du col et 35 cas de cancer du corps qui ont tous été contrôlés à la fois par la méthode de Papanicolaou et la cytophotométrie et qui ont été vérifiés histologiquement.

TABLEAU IV

Cancers du col : 115 cas.

	Positif	Négatif	Douteux
	—	—	—
Papanicolaou	79	10	26
Cytophotométrie	107	6	2

On note que la cytologie a dépisté **28 cas de cancer de plus** que la méthode de Papanicolaou en corrigeant 4 faux négatifs et 24 hésitations.

TABLEAU V

Cancers du corps : 35 cas.

	Positif	Négatif	Douteux
	—	—	—
Papanicolaou	14	14	7
Cytophotométrie	16	13	6

La cytophotométrie n'a décelé **que 2 cancers de plus** que la méthode de Papanicolaou en corrigeant un faux négatif et une hésitation.

II. - MESURE CYTOPHOTOMÉTRIQUE DES FROTTIS DE SURVEILLANCE DES CANCERS DU COL IRRADIÉS (40)

Nous rapportons les premiers résultats de l'évaluation d'un matériel cytologique déjà ancien, que nous avons repris dans le but d'étudier l'influence de l'irradiation sur le contenu en A.D.N. des noyaux de cancers du col utérin traités par curiethérapie (60 mcd) puis par hystérectomie et lymphadénectomie. Cette étude porte sur 26 cas représentant 250 prélèvements examinés.

Nous avons noté, sur les lames, à la suite de l'irradiation, des modifications de structure et de taille nucléaires, qui affectent à la fois les cellules néoplasiques et les cellules bénignes.

Les noyaux néoplasiques présentent sous l'action des radiations une **augmentation considérable de leur taille** (15 à 30 microns). Cette augmentation se fait sans augmentation du matériel chromatinien, mais semble-t-il, par fragmentation de la chromatine, qui est dissociée par un réseau de vacuoles donnant au noyau un aspect réticulé. Parmi ces vacuoles, on reconnaît le vide qui marque la place du **nucléole très hypertrophié**.

La chromatine apparaît, en coloration de Feulgen, d'abord condensée contre la membrane et les cloisons des vacuoles, puis rapidement elle s'éclaircit, les structures s'estompent, les contours nucléaires disparaissent, le noyau devient clair, hyalin, les teneurs en A.D.N. sont très inférieures à la normale. Enfin, la dégénérescence s'achève et le noyau disparaît.

Les noyaux des cellules bénignes subissent parallèlement une **augmentation importante de leurs dimensions**, qui entraîne une diminution proportionnelle de leur densité optique, les teneurs globales en A.D.N. n'étant pas augmentées, **mais au contraire diminuées** (41).

Puis au cours du deuxième mois, les noyaux retrouvent leur taille et leur structure normales, avec une chromatine finement granuleuse ; toutefois, la teneur en A.D.N. reste encore **inférieure à la normale pendant 12 à 18 mois**, le cytoplasme prend un aspect étoilé faiblement basophile, et nous désignons ces éléments sous le nom de **cellules cicatricielles**.

Cette évolution semble correspondre à une **bonne réponse aux radiations** (fig. 3).

Par contre, les cas où la chute des teneurs en A.D.N. et la mégakaryose transitoires ne se produisent pas, semblent correspondre aux **mauvaises réponses aux radiations** (fig. 4).

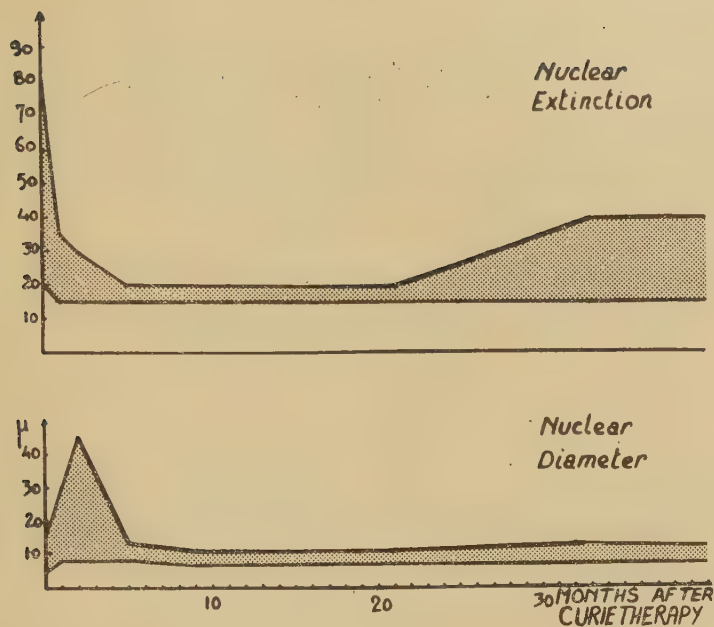


Fig. 3 *.

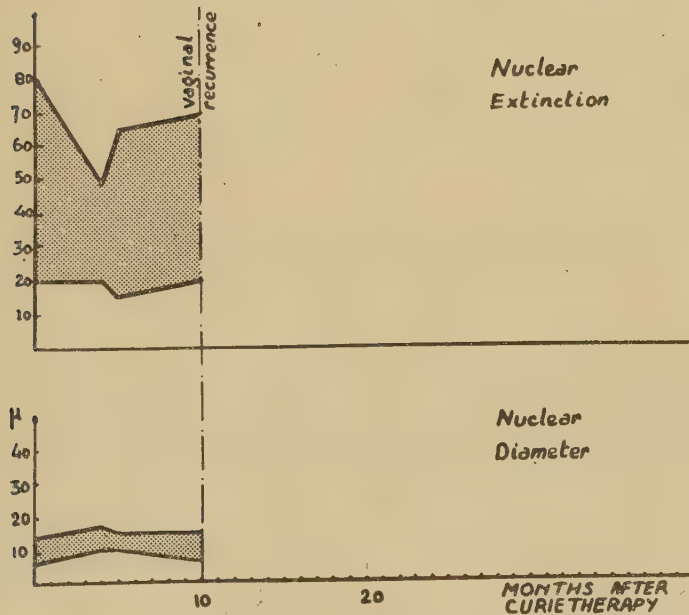


Fig. 4.

* D'après Acta Cytologica (40).

En effet, sur 6 cas ayant récidivé après traitement, 4 présentaient une telle courbe, alors que sur 20 cas n'ayant pas récidivé après deux à trois ans, 19 présentaient une courbe de bonne réponse, et un seul une courbe du deuxième type. Il faut toutefois noter que dans ce cas, les cytologies de routine sont depuis plusieurs mois du groupe V de Papanicolaou et les contrôles cytophotométriques très positifs ; néanmoins, cliniquement, la malade ne présente aucun symptôme alarmant.

C. — COMMENTAIRES

Le nombre des erreurs et des hésitations de la cytologie considéré dans ce travail apparaît anormalement élevé par rapport au nombre de cas rapportés, et, de ce fait, le diagnostic cytologique peut être de prime abord jugé décevant.

En fait, il convient de préciser de nouveau que le matériel évalué cytophotométriquement **représente des cas qui ont été sélectionnés en raison de la difficulté de diagnostic** qu'ils présentaient ; cette étude groupe ainsi la presque totalité des erreurs et des hésitations notées au laboratoire depuis environ six ans ; un grand nombre de préparations ayant été reprises pour être mesurées après décoloration selon la technique indiquée plus haut.

Pour apprécier les résultats du diagnostic cytologique et l'amélioration qu'apporte l'association de la cytophotométrie, il faut se référer à des statistiques faisant état du nombre de ces cas erronés ou hésitants en fonction du nombre total de cas examinés pendant la même période.

Nous citons à titre indicatif la statistique globale du dépistage cytologique effectué en 1959 dans la Clinique du Professeur Pollosson et le service de Gynécologie du Docteur Mathieu, chez des femmes porteuses de lésions cervicales ou présentant des signes fonctionnels suspects.

TABLEAU VI

Nombre de malades : 1.344

	Positif		Négatif		Douteux	
	Cytologie de routine	Cytophoto- métrie associée (Note 1)	Cytologie de routine	Cytophoto- métrie associée	Cytologie de routine	Cytophoto- métrie associée
Pas de cancer : 1.248	11	6	1.234	1.242	3	0
Cancer du col : 77	72	77	3	0	2	0
Cancer du corps : 19	13	13	5	5	1	1

Pourcentage des erreurs et hésitations

	Erreurs		Hésitations	
	Cytologie de routine	Cytophoto- métrie associée	Cytologie de routine	Cytophoto- métrie associée
Pas de cancer.....	0,87 %	0,48 %	0,2 %	0
Cancer du col.....	3,9 %	0	2,6 %	0
Cancer du corps.....	26,3 %	26,3 %	5,7 %	5,7 %

On voit ainsi dans cette statistique qu'en ce qui concerne les cancers du col, le nombre des erreurs et des hésitations apparaît réduit et que si l'on utilise la cytophotométrie, leur pourcentage diminue encore d'une façon très sensible.

L'étude de cette statistique limitée dans le temps aussi bien que l'ensemble des résultats rapportés dans les tableaux I à V, indiquent nettement que **la méthode n'a pas la même valeur pour les deux types de cancer étudiés, cancers cervicaux et cancers du corps utérin.**

C'est dans les cas de cancers cervicaux que l'application de la cytophotométrie s'avère vraiment efficace. En effet, on a pu, grâce à elle, mettre en évidence 28 cas de cancer de plus que

Note 1. — Le contrôle cytophotométrique a été effectué sur toutes les lames dont le diagnostic a été erroné ou incertain. Ni les cas négatifs, ni les cas positifs évidents n'ont été contrôlés.

par la méthode de routine, alors que dans les cas de cancer du corps, 2 cas de plus seulement ont été dépistés.

Il convient donc d'étudier séparément nos résultats dans les deux types de cancers.

a) Cancers du col.

— 28 cas de cancers du col, qui avaient échappé au diagnostic de routine, ont été révélés par le contrôle cytophotométrique. Nous avons analysé les circonstances qui ont pu masquer les caractères de malignité des noyaux de ces lames traitées par le colorant de Papanicolaou, et avons noté, à l'origine de l'erreur cytologique, trois facteurs qui interviennent avec une égale fréquence : **les erreurs de fixation des prélèvements** (Note), **l'inflammation**, et **la présence de sang en abondance**.

Ces trois facteurs sont susceptibles d'atténuer, dans certains cas, l'affinité des noyaux pour l'hématoxyline et de rendre ainsi le diagnostic de routine erroné ou hésitant. Il est remarquable, au contraire, que la réaction de Feulgen ne soit pas modifiée dans la plupart de ces cas, permettant ainsi d'effectuer un diagnostic cytophotométrique.

Une autre cause fréquente d'erreur est la présence, dans les frottis, d'un facteur avéré de dyskaryoses.

Des facteurs inflammatoires peuvent modifier la chromatophilie nucléaire, l'affinité tinctoriale du cytoplasme, et même la structure de la chromatine des noyaux. En particulier, les altérations nucléo-cytoplasmiques dues à la **vaginite à trichomonas** sont caractéristiques et ont fait l'objet de nombreuses descriptions où l'on a mis l'accent sur les erreurs de dépistage dues à ce type d'inflammation.

Dans un certain nombre de ces cas, il est difficile de dire si toutes les altérations nucléaires constatées sont imputables à l'existence du parasite ou si quelques-unes d'entre elles ont pour origine un néoplasme associé à la parasitose ; des erreurs peuvent alors être commises.

La cytophotométrie, en différenciant les cellules néoplasiques des cellules dyskaryotiques d'origine inflammatoire, permet de rapporter les altérations cellulaires à leur véritable cause.

— Mais l'évaluation quantitative n'entraîne pas la suppression de toutes les erreurs. C'est ainsi que 6 cas de cancer du col ont échappé à la fois au diagnostic de routine et au contrôle cytophotométrique, c'est-à-dire que les lames correspondantes ne contenaient aucune cellule à caractère néoplasique.

Note. — Les erreurs de fixation (44) sont dues en général à la dessiccation du matériel cytologique au cours du prélèvement ou à la mauvaise qualité du fixateur.

La cause la plus fréquente de ce type d'erreur correspond, à notre avis, à des prélèvements effectués sur des **tumeurs examinées à des stades avancés de leur évolution** ; les phénomènes de nécrose et d'autolyse cellulaires auxquels s'ajoute toujours un degré important d'infection empêchent la coloration des noyaux dans l'une et l'autre méthode.

En fait, dans ces cas, le diagnostic cytologique ne s'impose pas puisque cliniquement, la malignité est le plus souvent évidente.

On doit insister davantage sur d'autres facteurs responsables de ces diagnostics faussement négatifs : **le mode de prélèvement, l'hémorragie et l'absence de desquamation.**

— **Le prélèvement** ne doit pas être fait par aspiration non contrôlée, mais après mise en place d'un spéculum, par grattage direct de la zone cervicale suspecte et prélèvement des sécrétions amassées dans le cul-de-sac postérieur. A la Clinique Gynécologique, un troisième prélèvement est effectué dans le canal cervical.

— **L'hémorragie** intervient en diluant les éléments ; les lames sont pauvres en cellules et les chances d'y rencontrer des noyaux néoplasiques sont diminuées d'autant.

— **L'absence de desquamation** est un phénomène plus rare. Néanmoins, dans un cas, nous avons nous-même constaté que des prélèvements effectués par grattage sur une lésion néoplasique de la lèvre supérieure du col ont été négatifs à plusieurs reprises. Il s'agissait histologiquement d'une lésion kératinisée en surface et dont l'extension néoplasique s'effectuait en profondeur.

— **La cytophotométrie n'est pas non plus exempte de cas douteux.** Nous rappelons que nous considérons comme douteuses les lames qui contiennent un à trois noyaux de teneur en A.D.N. supérieure à 6N. Avec notre expérience actuelle, nous pensons que **ces cas doivent être tenus pour très suspects** bien que l'on n'affirme pas la malignité.

En effet, sur un total de 9 cytophotométries douteuses, 8 correspondent à des cancers du col ou du corps.

b) **Cancers du corps.**

Dans les cas de cancer du corps, les résultats du contrôle cytophotométrique n'ont pas été ce que nous escomptions. Nous retrouvons un pourcentage de cancers non dépistés presque équivalent à celui de la méthode de routine.

On sait que l'erreur du diagnostic selon Papanicolaou varie de 25 à 30 % dans ce type de cancer, pour des raisons qui tiennent

à la fois au **caractère des cellules desquamées** et au **mode de prélèvement**.

Dans les cellules néoplasiques de l'endomètre, nous n'avons jamais noté d'augmentation du contenu en A.D.N. aussi importante que dans les épithéliomas malpighiens ; dans certains cas même, il n'est pas possible de faire apparaître une différence entre les cellules normales et les cellules pathologiques : ainsi, dans plusieurs cas où la méthode cytologique avait donné des résultats faussement négatifs, il nous a été possible d'effectuer des empreintes directes de la tumeur sur pièce d'hystérectomie : les cellules tumorales étaient identiques à celles des frottis et leur morphologie et leur contenu en A.D.N. rigoureusement normaux. Dans ces cas, le diagnostic cytologique est impossible.

Mais à côté de ce type, somme toute peu fréquent, d'erreurs obligatoires inhérent aux caractères même des cellules cancéreuses endométriales, il existe une autre source d'erreur assez facilement réductible celle-là, et qui est due au prélèvement.

En effet, il faut essayer, dans toute méthode cytologique, d'obtenir des étalements cellulaires recueillis le plus près possible du lieu de la desquamation, en particulier lorsque les éléments sont fragiles, comme c'est le cas des cellules cylindriques.

Ainsi, dans le dépistage du cancer du corps, **c'est la technique des prélèvements intra-utérins qui doit être utilisée.**

Différentes statistiques comparent le pourcentage de cancers du corps dépistés suivant le niveau où a été effectué le prélèvement.

Nous extrayons les chiffres suivants de celle de Von Haam (37), qui porte sur le plus grand nombre de cas :

Pourcentage de diagnostics cytologiques positifs en fonction du lieu de prélèvement dans 62 cas de cancer de l'endomètre :

- aspiration vaginale : 57 %.
- grattage cervical : 48 %.
- frottis endométriaux : 67 %.

À côté de la technique classique d'aspiration intra-cavitaire à la sonde rigide, on a proposé l'introduction de différents moyens susceptibles de fournir des étalements plus riches en cellules : Boschann (36), pour éviter la pollution du matériel endométrial par les cellules endocervicales, emploie des « brosses » intra-utérines passées au travers du canal cervical dans un tube métallique. Haour (38) recommande de ne pas étaler les mucosités recueillies, mais de les diluer dans du sérum physiologique. Au laboratoire, le liquide est centrifugé et les lames faites à partir du culot sont alors plus riches en cellules.

Si ces conditions de prélèvement sont réalisées, l'erreur commise dans le dépistage des cancers endométriaux est beaucoup

moins importante, mais pour les raisons exposées plus haut, nous ne pensons pas qu'elle puisse jamais être aussi faible que dans les cas de cancer malpighien.

c) Faux positifs.

Les cas que nous appelons faux positifs, sont ceux dont les cytologies contiennent des cellules cancéreuses alors que le contrôle biopsique effectué a révélé une lésion bénigne.

Les chiffres des tableaux II et III en font ressortir un total de 9 cas.

Il convient d'étudier leur évolution.

— 2 n'ont plus consulté après le premier examen alors que colposcopiquement elles présentaient une base de leucoplasie suspecte et que cliniquement on pensait à un néoplasme.

— 2 se sont négativées cytologiquement après hystérectomie totale à la suite d'une longue série de frottis positifs ; aucune des deux pièces n'a fait l'objet de coupes sériées.

— 1 s'est négativée spontanément au deuxième examen et demeure négative.

— Les 4 autres ont toujours présenté et présentent encore des cytologies positives à tous les examens. Tant que la preuve histologique de la malignité de la lésion n'est pas apportée, nous considérons ces cas, dans nos statistiques, comme des erreurs de la cytologie. **Mais cliniquement, nous les considérons comme des malades porteuses de lésions à potentialité maligne et les surveillons en conséquence.**

En effet, 11 autres cas, que nous avons fait figurer pendant des temps plus ou moins longs dans la liste de nos erreurs parce qu'ils présentaient des cytologies positives persistantes alors qu'une ou plusieurs biopsies étaient négatives, ont finalement fait la preuve de leur malignité après une **latence histologique de 3 à 37 mois.**

Nous résumons l'évolution de ces cas dans le tableau VII.

Dans ces 11 cas, on peut dire que la positivité persistante de la cytologie a fait surveiller ces malades très attentivement et a permis de dépister les lésions malignes au début de leur évolution.

La longueur de la latence histologique de ces lésions explique le nombre comparativement élevé des faux positifs relevés dans notre statistique de 1959 (6 cas sur un total de 9), **mais nous sommes convaincus qu'un certain nombre de ces diagnostics cytologiques risque fort d'être confirmé dans des délais plus ou moins grands et c'est pourquoi les malades qui en sont l'objet doivent être surveillées rigoureusement et régulièrement par les**

TABLEAU VII

Numéro de classement Age	Date de la première cytologie positive	Nombre de Biopsies négatives	Nombre de Cytologies positives	Date de la première biopsie positive	Durée de la latence histologique	Diagnostic
N° 224 50 ans	30.4.51	1	6	14.1.54	31 mois	Epithélioma in situ.
N° 90 49 ans	19.1.52	1	3	6.12.53	23 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade II.
N° 54 43 ans	6.8.53	1	6	23.2.55	19 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade I.
N° 22 41 ans	14.9.54	1	2	20.12.57	37 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade I.
N° 37 39 ans	1.4.55	1	3	13.5.57	25 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade I.
N° 77 36 ans	15.10.56	2	4	11.11.57	4 mois	Epithélioma in situ.
N° 258 59 ans	8.4.57	3	4	23.10.58	18 mois	Epithélioma in situ.
N° 1111 30 ans	16.7.58	1	6	6.3.59	17 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade I.
N° 1588 41 ans	2.12.58	1	3	2.2.59	3 mois	Epithélioma spi- no-cellulaire in- vasif. Stade I.
N° 1640 55 ans	23.12.58	1	3	7.3.59	3 mois	Epith. endocol. In situ.
N° 1885 37 ans	2.3.59	1	3	21.1.60	10 mois	Epithélioma in situ.

cliniciens, puisque sur 15 cas de cytologies positives persistantes considérés primitivement comme des erreurs, 11 ont à ce jour fait la preuve de leur malignité.



A côté de ce travail basé sur une expérience relativement importante de cas de dépistage, nous avons présenté une étude de **cancers traités par curiethérapie**. Mais cette étude concerne un nombre beaucoup plus restreint de cas, chacun d'eux demandant, en effet, d'être suivi assez longuement après le traitement.

Il semble que peu d'études aient été faites sur l'action des radiations sur l'A.D.N. in vivo. Les quelques travaux dont nous avons eu connaissance, ceux de Feinstein et Butler (42) et de Limperos et Mosher (43) semblent bien confirmer ce qui a été constaté par beaucoup d'autres in vitro (46) : la dénaturation des molécules d'A.D.N. avec modification de leurs propriétés physiques et chimiques.

On ne peut encore cependant envisager la possibilité d'un pronostic évolutif fondé sur la mesure cytophotométrique, les éléments que nous avons réunis n'étant pas assez importants et le recul encore insuffisant pour que nous puissions en tirer des conclusions pratiques.

Il est néanmoins intéressant de noter la relation que nous avons trouvée entre la chute de l'A.D.N. nucléaire et l'évolution des 26 cas que nous avons étudiés.

CONCLUSIONS

Dans le but de réduire le nombre des erreurs et des hésitations de la méthode de routine de dépistage cytologique des cancers gynécologiques, nous avons associé à la technique morphologique de Papanicolaou un procédé quantitatif d'étude des noyaux cellulaires : nous nous sommes adressés à la mesure cytophotométrique de la teneur en acide désoxyribonucléique des noyaux colorés par la réaction de Feulgen.

La première partie de notre travail est un rappel d'un certain nombre de données générales concernant les acides nucléiques, la coloration de Feulgen, et la mesure cytophotométrique.

La seconde partie est l'exposé de notre travail personnel. Nous y décrivons l'application au diagnostic cytologique que nous avons mise au point à partir des données théoriques précédentes, ainsi qu'un procédé nouveau de décoloration qui permet le contrôle cytophotométrique des noyaux même qui ont paru suspects dans l'évaluation de routine.

Nous terminons en rapportant les résultats du contrôle cytophotométrique de 498 cas de cytologies hésitantes ou erronées, et de 26 cas de cancers du col irradiés dont nous avons suivi l'évolution.

L'avantage principal de cette méthode est la réduction du nombre des erreurs et hésitations qu'entraîne le dépistage de routine : ceci est évident dans les cas de cancers du col. Dans le dépistage des cancers endo-utérins, son efficacité est discutable ; encore faudrait-il, pour s'en assurer, tenir compte dans des recherches ultérieures des conditions de prélèvement qui doivent être réservées à ce type de cancer et qui n'ont pas toujours été respectées dans le matériel que nous avons examiné.

Les résultats des mesures obtenues contribuent à vérifier la relation qui existe entre le contenu en acide désoxyribonucléique des noyaux et le processus néoplasique.

La méthode cytophotométrique, bien qu'elle ne puisse être utilisée comme procédé de routine, mérite donc d'être appliquée en cytologie aux cas posant des difficultés de diagnostic.

Tout sujet présentant un contrôle cytophotométrique répondant aux critères quantitatifs établis pour la malignité doit, même si ce résultat est en désaccord avec celui de l'anatomie pathologique, faire l'objet d'une surveillance attentive : en effet, sur 15 cas de cytologies positives persistantes avec biopsie négative relevés au laboratoire, 11, dans des délais plus ou moins grands, ont fait la preuve de leur malignité.

Par ailleurs, les résultats de la surveillance cytophotométrique de 26 cas de cancers du col irradiés permettent de penser qu'un élément de pronostic pourrait peut-être ressortir de l'étude d'un matériel plus important.

Le Doyen,
H. HERMANN.

Le Président de la Thèse,
POLLOSSON.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 9 Juin 1960.

Le Recteur, Président du Conseil de l'Université,
André ALLIX.

BIBLIOGRAPHIE

Abréviations utilisées

- A. Anat. : Acta Anatomica.
A. Biol. : Archives de Biologie.
A. Cyt. : Acta Cytologica.
A. Meeting Cyt. : Annual Meeting of the Inter-Society cytology council.
A. Path. : Archives of Pathology.
A. Radiol. : Acta Radiologica.
A. Unio Intern. Contra Cancrum : Acta Unio Internationalis contra cancrum.
Am. J. Path. : American Journal of Pathology.
Am. J. Roentgenol. : American Journal of Roentgenology.
Arch. Gyn. : Archiv für Gynäkologie.
Biol. : Comptes rendus de la Société de Biologie.
Bull. Biol. : Bulletin Biologique de la France et de Belgique (Paris).
Bull. Hist. : Bulletin d'Histologie appliquée à la Physiologie et à la Pathologie.
Cold. Spring Harb. : Cold Spring Harbourg symposia.
Hoppe-S. : Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische chemie.
Nat. : Nature (London).
Proc. Nat. Acad. Sc. : Proceedings of the National Academy of Sciences.
Proc. Soc. Exp. Biol. : Proceedings of the Society for experimental biology.
Rev. Gyn. Obst. : Revue Française de Gynécologie et d'Obstétrique.
Skand. Arch. Physiol. : Skandinavisches Archiv für physiologica (Berlin).
Stain Techn. : Stain Technology.
Symp. Soc. Exp. Biol. : Symposia of the Society for experimental biology.

1. BRACHET J. — Symp. Soc. Exp. Biol., 1, 1947.
2. OVEREND W.G. et STACEY M. — Nat., 163, 1949.
3. POLLISTER A.W. et LEUCHTENBERGER R. — Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.A., 35 : 66, 1949.
4. CASPERSSON T. — Skand. Arch. Physiol., 73, suppl., 8, 1936.
5. CASPERSSON T. et SANTESSON T. — Act. Radiol. Suppl. 46, 1942. Cytochemical studies of nucleic acids and protein metabolism (Harvard Monographs, 1946).
6. BRACHET J. — Biol., 133 : 88, 1940. - A. Biol., 53 : 207, 1941. - Enzymo., 10 : 87, 1941. - Embryologie chimique (Desoer, Liège, 1945). - Cold. Spring. Harb., 12 : 18, 1948.
7. BRACHET J. — Symp. Soc. Exp. Biol., 1 : 225, 1947.
8. TRUCHINI J., CASTEL P., KAU-VAN KIEN. — Bull. Hist., 21 : 396, 1944. - Biol. 139 : 584, 1945 ; 142 : 1277, 1948 - Montpellier Médical, 25 : 396, 1944.
9. SANDRITTER W. & MULLER D. — A. Unio Intern. Contra cancerum, 14 : n° 4, 408, 1958. - A. Cyt., 2 : 324, 1958.
10. SANDRITTER W., CRAMER H., MONDORF W. — Arch. Gyn., 192 : 293, 1960.
11. FEULGEN R. & ROSSENBECK H. — Hoppe-S., 135 : 208, 1924.
12. OVEREND W.G. & STACEY M. — Nat., 163 : 538, 1949.
13. LISON L. — Histochimie et Cytochimie animales. Gauthiers-Villars, édit., Paris, 1953.
14. STOWELL R.E. & ALBERS V.M. — Stain technol., 18 : 57, 1943.
15. LISON L. — Act. Anat., 10 : 333, 1950.

16. MIRSKY A.E. & RIS H. — Nat., 163 : 666, 1949.
17. PAPANICOLAOU G.N. — Atlas of exfoliative cytology, Harvard, 1954.
18. BOURG R., GOMPEL C. & PUNDEL J.P. — Diagnostic cytologique du cancer génital. Desoer, Liège, et Masson, édit., Paris, 1954.
19. LOPES CARDOZO P. — Clinical Cytology. Stafleu-Leyden, édit., 1954.
20. GRAHAM R. — The Cytologic diagnosis of Cancer. Saunders, édit., Philadelphia, 1950.
21. A. Cyt. Vol. I, num. I, 1957.
22. De BRUX J. — A. Cyt., I : I, 45, 1957.
23. LEUCHTENBERGER C. et R. et DAVIS M. — Am. J. Path., 30 : 65, 1954.
24. VENDRELY C. et R. — L'A.D.N., substance fondamentale de la cellule vivante. A. Legrand, édit., Paris, 1957. - Bull. Biol., 86 : I, 1952. - Int. Rev. of Cytochem., 1956.
25. MELLORS R.C. — Analytical Cytology. Mac Graw Hill, édit., N.Y., 1955.
26. VOKAER R. — A. Unio Intern. contra cancrum, 14 : 4, 413, 1958.
27. BOSCHANN H.W. — A. Cyt., I : I, 30, 1957.
28. WIED G. — A. Cyt., I : I, 33, 1957.
29. HAOUR P. et NIEL H. — Biol., 148 : 1839, 1954.
30. NIEL H. — Thèse de Lyon, 1956.
31. HAOUR P. et CONTI C. — A. Unio Intern. contra cancrum, 14 : 4, 405, 1958.
32. HAOUR P. & CONTI C. — Rev. Gyn. Obst., 9 : 10, 1958.
33. HARKIN J. — 3d A. Meeting Cyt., 37, 1955.

34. LINDER A. — 5th A. Meeting Cyt., 13, 1957.
 35. POLLISTER A.W. & MIRSKI A.E. — Nat., 152 : 692, 1943.
 36. BOSCHANN H.W. — A. Cyt., 2 : 3, 572, 1958.
 37. VON HAAM E. — A. Cyt., 2 : 3, 580, 1958.
 38. HAOUR P. — A. Cyt., 2 : 3, 566, 1958.
 39. HAOUR P. & CONTI C. — A. Cyt., 2 : 2, 326, 1958.
 40. HAOUR P. & CONTI C. — A. Cyt. 3 Radiation cell changes (in press).
 41. HEROVICI C. — A. Cyt., 2 : 2, 225, 1958.
 42. FEINSTEIN R.N. & BUTLER C.L. — Proc. Soc. Exp. Biol., 79 : 181, 1952.
 43. LIMPEROS G. et MOSHER W.A. — Am. J. Roentgenol., 63 : 691, 1950.
 44. PUNDEL J.P. et disc. — A. Cyt., 1 : 1, 62, 1957.
 45. CASPERSSON T. — A. Unio Intern. contra cancrum, 14 : 4, 397, 1958.
 46. BACQ Z.M. & ALEXANDER P. — Principes de radiobiologie, Masson & Cie, édit., Paris, 1955.
-

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	17
 PREMIÈRE PARTIE. — L'acide désoxyribonucléique et sa mesure histophotométrique. Données techniques.	
CHAPITRE PREMIER. — Les acides nucléiques. Procédés de détection et de mesure	21
A. — Localisation des acides nucléiques dans la cellule	22
B. — Constitution chimique des acides nucléiques	22
C. — Détection des acides nucléiques	24
CHAPITRE II. — La réaction de Feulgen et la mesure photométrique de l'A.D.N. dans les noyaux	26
A. — Techniques de la coloration de Feulgen	26
B. — Principe de la mesure photométrique in situ	28
1. L'appareillage optique	29
2. L'appareillage électronique	30
3. Validité des mesures photométriques	31
C. — Validité des mesures quantitatives de l'A.D.N. pour la méthode cytophotométrique	33
 DEUXIÈME PARTIE. — Application de la mesure cytophotométrique de l'A.D.N. au dépistage cytologique.	
GÉNÉRALITÉS	37
A. — Méthodes	41
I. - Unité de mesure et base de référence reproductible	42
II. - Critères cytophotométriques de malignité	43
III. - Procédé de décoloration du matériel de la cytologie de routine	46
a) Techniques	46
b) Etude critique	47
c) Avantages	48
IV. - Conduite pratique de la mesure photométrique	48

B. — Résultats	49
Matériel	49
I. - Contrôle cytophotométrique de 398 cas de cytologies hésitantes ou erronées	50
a) Résultats de la cytophotométrie en fonction de la cytologie de routine	50
b) Résultats comparés de la méthode de Papanicolaou et de la cytophotométrie dans le dépistage des cancers	53
II. - Mesure cytophotométrique des frottis de surveillance des cancers du col irradiés	54
C. — Commentaires	56
a) Cancer du col	58
b) Cancer du corps	59
c) Faux positifs	61
CONCLUSIONS	65
BIBLIOGRAPHIE	67
TABLE DES MATIÈRES	71
